Über die freien Aminosäuren des Liquor cerebrospinalis und ihren Nachweis mit kombinierten papierchromatographischen und elektropherographischen Methoden

Wolodymyr G. Mialkowsky

Aus der II. Medizinischen Klinik der Universität München
Direktor: Professor Dr. Dr. G. Bodechtel

ÜBER DIE FREIEN AMINOSÄUREN DES LIQUOR CEREBROSPINALIS UND IHREN NACHWEIS MIT KOMBINIERTEN PAPIERCHROMATOGRAPHISCHEN UND ELEKTROPHEROGRAPHISCHEN METHODEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Wolodymyr G. Mialkowsky

aus

Luck

1959

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Referent: Professor Dr. H. Zickgraf

Korreferent: Professor Dr. Dr. G. Bodechtel
Dekan: Professor Dr. K. Kolle

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Juli 1959

UNI-Druck, München 13, Amalienstraße 85

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
II. Auswahl der Fälle	4
III. Methodik	6
A. Aufbereitung des Liquors	6
B. Chromatographische bzw. hochspannungs-elektrophoretische Trennung der Liquor-aminosäuren	9
C. Färbeverfahren	12
IV. Ergebnisse	15
A. Kombinierte Elektropherographisch-chromatographische Trennung von Testgemischen	15
B. Ergebnisse bei der Auftrennung der Liquor-aminosäuren	18
V. Diskussion	22
VI. Zusammenfassung	28
VII. Literaturverzeichnis	29

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555221_0056

I. EINLEITUNG

Wie alle biologischen Flüssigkeiten stellt auch der Liquor cerebrospinalis ein sehr komplexes Gemisch der verschiedensten Substanzen dar. Die Schwierigkeit für den qualitativen Nachweis oder die quantitative Bestimmung einzelner Stoffe eines solchen Gemisches bestand lange Zeit in der Unmöglichkeit, sie ohne weiteres von den anderen Bestandteilen abzutrennen. Man mußte sich daher bei allen Untersuchungen auf Stoffe beschränken, die mit sehr spezifischen Reaktionen nachweisbar sind, oder sich mit Gruppenbestimmungen verschiedener homologer Substanzen zufrieden geben. So konnte der Aminostickstoff zwar als Ganzes bestimmt werden, die Identifizierung der einzelnen Aminosäuren, erst recht quantitative Angaben über ihr Vorkommen, waren dagegen kaum möglich. Man erinnere sich an die großen methodischen Schwierigkeiten, die HARRIS (23) noch vor wenigen Jahren bei der Identifizierung des Glutamins, der wichtigsten Liquoraminosäure, zu überwinden hatte.

Ein genaueres Bild über das physiologische Vorkommen der Aminosäuren im Liquor konnte erst durch Einführung mikrobiologischer Methoden gewonnen werden, d.h. durch die Möglichkeit, das Wachstum eines Mikroorganismus, der sich aus einem angebotenen Gemisch eine bestimmte Säure herauswählt, zur quantitativen Bestimmung dieser Säure zu benutzen. Pionierarbeit wurde hier von SOLOMON und Mitarbeitern (64) geleistet, die für die wichtigsten freien Aminosäuren des Liquors erstmalig quantitative Angaben vorlegen konnten. KAZMEIER (32) bestimmte auf diese Weise die Gesamtaminosäuren des nichteiweißten Liquors. Die ziemlich aufwendigen mikrobiologischen Methoden empfahlen sich der Klinik jedoch nur in relativ wenig Fällen. Die Einführung chromatographischer Trennungsverfahren gestattete dann komplexe Gemische verschiedener homologer Substanzen in ihre Einzelbestandteile zu zerlegen und getrennt nachzuweisen. Der Klinik wurde damit die Möglichkeit gegeben, die Gruppe der sog. Rest-N-Substanzen, auf einfache Weise aufzugliedern. Die Aminosäuren, die im Liquor einen wesentlichen Bestandteil des Rest-N ausmachen, traten dabei zunächst in den Vordergrund. Für ihre quantitative Bestimmung erwies sich die chromatographische Trennung an der Ionenaustauschersäule nach MOORE u. STEIN (48, 49) mit anschließender Kolorimetrie im Eluat als die genaueste Methode.

Für qualitative Arbeiten empfahl sich die mit geringerem Aufwand durchführbare Papierchromatographie (CONSDEN, GORDON u. MARTIN /12/), neuerdings auch die Hochspannungselektrophorese (MICHL /44, 45/, HEILMEYER u. Mitarbeiter /26, 27/, KICKHÖFEN u. WESTPHAL /37/, SPENGLER u.

KNEDEL /66/ u. a.). Untersuchungen über die Liquoraminosäuren wurden mit papierchromatographischen Methoden zuerst von DENT (17) angestellt.

Wenn die experimentellen Möglichkeiten der Klinik durch diese neuen Methoden auch wesentlich erweitert wurden, sind - aufs Ganze gesehen - die Ergebnisse für Physiologie und Pathologie des Liquor cerebrospinalis doch ziemlich spärlich geblieben. In der neuesten Auflage eines einschlägigen Handbuches (HOPPE / SEYLER, THIERFELDER /28/) sind über den Gesamtaminosäuregehalt des Normalliquors noch Angaben, die von weniger als 1 mg % bis 12 mg % schwanken. Die Aussagen über die einzelnen Aminosäuren sind noch ungenauer. Für einige ist gesichert, daß sie zu den regelmäßigen Bestandteilen des normalen Liquors gehören, über das konstante Vorkommen anderer Aminosäuren sind die Meinungen noch geteilt. Sie konnten von einigen Autoren gar nicht, von anderen nur gelegentlich nachgewiesen werden (SCHÖNENBERG /62/, SOLOMON /64/, WALKER, TELLES u. PASTORE /74/ u. a.). Über die quantitativen Verhältnisse besteht noch weniger Einigkeit. Überhaupt sind quantitative Arbeiten nach wie vor kaum vorhanden.

Ein Grund für die auffallenden Unterschiede schon der qualitativen Angaben liegt sicher in der Verschiedenheit der Methoden, die die einzelnen Autoren verwendeten. Der Art des methodischen Vorgehens kommt bei der chromatographischen Trennung der Liquoraminosäuren nämlich entscheidende Bedeutung zu. Auch wir haben daher längere Zeit benötigt, bis wir zu einer Standardisierung unseres Vorgehens kamen, die uns reproduzierbare Ergebnisse lieferte. Sie gestattete, mit tragbarem Zeitaufwand qualitative Analysen durchzuführen und dabei auch die Aminosäuren sicher zu erfassen, die normalerweise nur in sehr geringer Konzentration im Liquor vorkommen. Wir werden der Schilderung unserer Methodik daher auch einen ziemlich breiten Raum geben müssen.

Von Anfang an beschränkten wir uns bewußt auf die qualitative Analyse. Die Methode der Säulenchromatographie nach MOORE u. STEIN (48, 49) stand uns nicht zur Verfügung. Der Versuch, die mit größeren Verlustmöglichkeiten und Fehlerquellen arbeitende Papierchromatographie als quantitative Methode auszubauen, wäre zu aufwendig gewesen. Von verschiedenen Autoren wird diese Möglichkeit überhaupt abgelehnt (KOFRANYI /39/).

Die bisher vorliegenden Arbeiten über die freien Liquoraminosäuren beziehen sich vorwiegend auf die Zusammensetzung des normalen Liquors. Es wurden zwar von fast allen Untersuchern auch pathologische Fälle einbezogen (SOLOMON /64/, LOGOTHETIS /41/, TORRE /69/, LUDEWIG /42/, WALKER, TELLES u. PASTORE /75/, SCHÖNENBERG /60, 61, 62/ u. a.), aber wesentliche

Abweichungen, die für eine bestimmte Krankheit charakteristisch wären, konnten bisher nicht gefunden werden, sofern man von solchen Erkrankungen absieht, bei denen die Aminosäuren im Blutserum, sei es allgemein, sei es eine einzelne, wesentlich erhöht sind. Beispiele sind für ersteres u. a. das Lebercoma (WALSCHE /76/), für letzteres die Oligophrenia pyruvica (JERVIS u. Mitarbeiter /30/, SCHÖNENBERG /62/), bei der sich Phenylalanin in excessiver Menge auch im Liquor findet. Bei den eigentlichen Erkrankungen des ZNS, wie z.B. der multiplen Sklerose oder anderen Encephalitiden, den Systemerkrankungen, den Hirnatrophien oder den Hirntumoren konnten dagegen keine konstanten und charakteristischen Veränderungen gefunden werden (WALKER, TELLES u. PASTORE /75/, POND /54/, SCHÖNENBERG /61/, BAUER u. BOESCHE /6/). Selbst da, wo man gewisse Abweichungen von der Norm festzustellen glaubte (SCHÖNENBERG /60, 61, 62/), ist man sich über die Bedeutung der Befunde nicht im klaren. Insbesondere konnten aus diesen Untersuchungen keine neuen Gesichtspunkte über die Pathogenese oder die Art des betreffenden Leidens gewonnen werden. Neue Einblicke in den Aminosäurestoffwechsel des Gehirns selbst wurden ebenfalls nicht erbracht.

Ein wesentlicher Grund für diesen Mangel schien uns zunächst die Tatsache zu sein, daß bisher zu wenig Fälle untersucht wurden. Die für klinische Verhältnisse relativ komplizierten Methoden gestatteten nämlich trotz aller in neuer Zeit entwickelter Verbesserungen meist nur die Untersuchung und Mitteilung weniger Fälle oder aber verlangten die Beschränkung auf den Nachweis nur weniger Substanzen. Die Unsicherheit über das beim Normalen konstant vorkommende Aminosäurespektrum erschwert Aussagen über pathologische Veränderungen. Daher schienen uns erneute Untersuchungen der Liquoraminosäuren wünschenswert, die vor allem der Klärung der Frage dienen sollten, welche Aminosäuren normalerweise im Liquor erwartet werden können. Darüber hinaus sollte die Brauchbarkeit und Zweckmäßigkeit unserer Methodik zur qualitativen Aminosäurenanalyse zur Diskussion gestellt werden, die gestattete, 25 bis 27 verschiedene Substanzen im Liquor cerebrospinalis des Menschen getrennt nachzuweisen.

II. AUSWAHL DER FÄLLE

Insgesamt wurden über 30 Liquores untersucht. Jedoch beschränken wir uns hier auf die Mitteilung der 20 zuletzt bearbeiteten Fälle. Erst bei diesen hatten wir die Gewähr, daß unsere Methodik hinreichend entwickelt war. Wir sind daher bei diesen Fällen weitgehend vor Fehldeutungen durch mangelhafte Technik geschützt.

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über Alter, Geschlecht, klinische Diagnose und Liquorbefund.[1)] Wie man sieht, handelt es sich meist um Fälle, bei denen die klinischen Routinemethoden der Liquoruntersuchung keinen wesentlichen Befund ergeben hatten.

1) Die Liquores der Fälle 1 bis 6 wurden uns freundlicherweise von Herrn Priv. Doz. Dr. K. Decker, Universitätsnervenklinik München (Dir.: Prof. Dr. K. Kolle) zur Verfügung gestellt, wofür wir auch an dieser Stelle herzlich danken.

Tabelle 1.

Nr.	Name u. Vorname	Alter Geschl.	Klinische Diagnose	Liquorbefund				Luft-enchp.	EEG
				Zellzahl	Pandy	Kafka	Mastix		
1.	P. E.	59 F	Lues cerebri (serol. pos.), Hirnatrophie.	1/3	Opal	1,0 = 24,0 mg%	tief	++	++
2.	S. H.	23 F	Angiospastischer cerebraler Insult (?).	2/3	Opal.	1,5 = 36,0 mg%	norm.	ø	++
3.	W. M.	46 F	Hirnatrophie	1/3	Opal.	1,0 = 24,0 mg%	norm.	+++	+
4.	O. A.	26 F	Temporallappen Anfääle nach frühkindlicher Hirnschädigung	12/3	Opal.	1,0 = 24,0 mg%	norm.	+++	+++
5.	G. M.	22 F	Psychopathie	4/3	Opal.	0,9 = 22,0 mg%	norm.	ø	ø
6.	B. R.	47 F	Epilipsie	1/3	Opal.	0,5 =	norm.		+
7.	K. M.	43 F	Vorzeitige Gefässsklerose mit deutlicher Herabsetzung der cerebralen Zirkulation.	5/3	Opal.	1,3 = 31,0 mg%	norm.	ø	ø
8.	M. B.	54 M	Postencephalitischer Parkinsonismus u. Altersdiabetes.	8/3	Trüb.	1,8 = 43,2 mg%	tief li.		
9.	S. W.	22 M	Symptomatische Epilepsie nach Kopftrauma.	12/3	Trüb.	1,5 = 36,0 mg%	norm.	ø	ø
10.	H. A.	50 F	Inselzelladenom	5/3	stark Opal.	1,3 = 31,2 mg%	norm.	ø	ø
11.	B. O.	30 F	Little Syndrom, Tetraspastik.	1/3	Opal.	1,0 = 24,0 mg%	norm.		ø
12.	R. M.	62 F	Chromophobes Adenom der Hypophyse.	28/3	Trüb.	1,7 = 40,6 mg%	norm.	+++	ø
13.	W. J.	33 M	Genuine Epilepsie und chron. Hepatitis.	2/3	Opal.	1,0 = 24,0 mg%	norm.	++	+++
14.	K. H.	47 F	Diabetes insipidus.	6/3	Opal.	0,8 = 19,2 mg%	norm.	+	ø
15.	B. M.	20 F	Ungeklärtes Anfallsleiden.	1/3	Opal.	1,0 = 24,0 mg%	norm.	ø	++
16.	B. J.	39 M	Gefässbedingter Hydrocephalus internus.	12/3	Opal.	1,0 = 24,0 mg%	norm.	+++	ø
17.	G. J.	34 M	Verdacht auf Hirntumor. Rheumatismus.	2/3	Opal.	1,0 = 24,0 mg%	norm.	++	ø
18.	B. J.	47 M	Verschluss der A. cerebri med. mit Infarktierung d. Gewebes.	81/3	Trüb.	1,8 = 43,2 mg%	norm.	++	+++
19.	B. O.	45 M	Beginnende Gefässerkrankung (Morbus Bürger?)	12/3	stark Opal.	1,4 = 33,6 mg%	norm.	ø	ø
20.	S. R.	40 F	Psychopathie, (alte behandelte Lues).	3/3	Opal.	1,1 = 26,4 mg%	norm-		

Tabelle 1: Übersicht über die mitgeteilten Fälle. * +++ = st. pathol.
ø = o. B.

III. METHODIK

A. Aufbereitung des Liquors

Sämtliche Liquores wurden durch Lumbalpunktion entnommen. Die Ausgangsmenge für die weitere Aufarbeitung betrug 5 bis 10ml. Wenn die Liquores nicht unverzüglich nach der Entnahme weiter verarbeitet werden konnten, wurden sie bei -20° C in der Tiefkühltruhe aufbewahrt. Sie wurden dann im Kühlraum mit der doppelten Menge vorgekühlten Azetons oder in einigen Fällen der vierfachen Menge Aethanols versetzt. Nach halbstündigem Stehen und mehrfachem Umrühren wurden sie in einer Kühlzentrifuge mit 10 000 Umdrehungen pro Minute scharf zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit vorsichtig vom Eiweißniederschlag getrennt. In Kontrollversuchen war es uns nicht möglich, durch irgendein Eiweißfällungsmittel in dieser Flüssigkeit erneut eine Opaleszenz zu bekommen. Ein Unterschied zwischen Azeton- und Aethanolenteiweissung ergab sich nicht. Anschließend wurde das Liquor-Azetongemisch im Exsikkator fast bis zur Trockene eingeengt. Gefriertrocknung erbrachte keine Vorteile, so daß darauf verzichtet werden konnte.

Der weitgehend eingeengte, enteiweißte Liquor wurde anschließend mit Aqua dest. wieder auf das ursprüngliche Volumen gebracht und nach CONSDEN, GORDON u. MARTIN (13) elektrolytisch entsalzt.[1)] Wir bedienten uns dazu einer Entsalzungsapparatur nach der Modifikation von ASTRUP, STAGE u. OLSEN (3), die sich nach Vorversuchen mit der ursprünglichen CONSDEN'schen Apparatur als zweckmäßiger zur Entsalzung kleiner Flüssigkeitsmengen erwies.

Bei der elektrolytischen Entsalzung kann es u.U. zur Zerstörung oder Umwandlung einzelner Aminosäuren kommen (ASTRUP, STAGE u. OLSEN /3/, STEIN u. MOORE /68/). Der Verlust ist bei den meisten Aminosäuren nicht sehr groß und abhängig von Entsalzungsdauer und Temperatur. Durch folgende Maßnahmen haben wir versucht, diese mögliche Fehlerquelle weitgehend zu eliminieren. Um die Elektrolysekammer unserer Apparatur ließen wir ein größeres Glasgefäß anbringen, das mit einer Kochsalz-Eis-Kältemischung gefüllt, als Kühlmantel diente (Abb. 1). Zusätzlich wurde die als Elektrolytlösung gebrauchte Schwefelsäure vorgekühlt. Dadurch gelang es uns, die Temperatur der zu entsalzenden Flüssigkeit während des gesamten Entsalzungsvorganges unter 25° C zu halten.

---

1) Die Entsalzung der Liquores 1 bis 10 wurde von Frl. H. Roth (s. Dissertation Roth) durchgeführt, wofür wir an dieser Stelle herzlich danken.

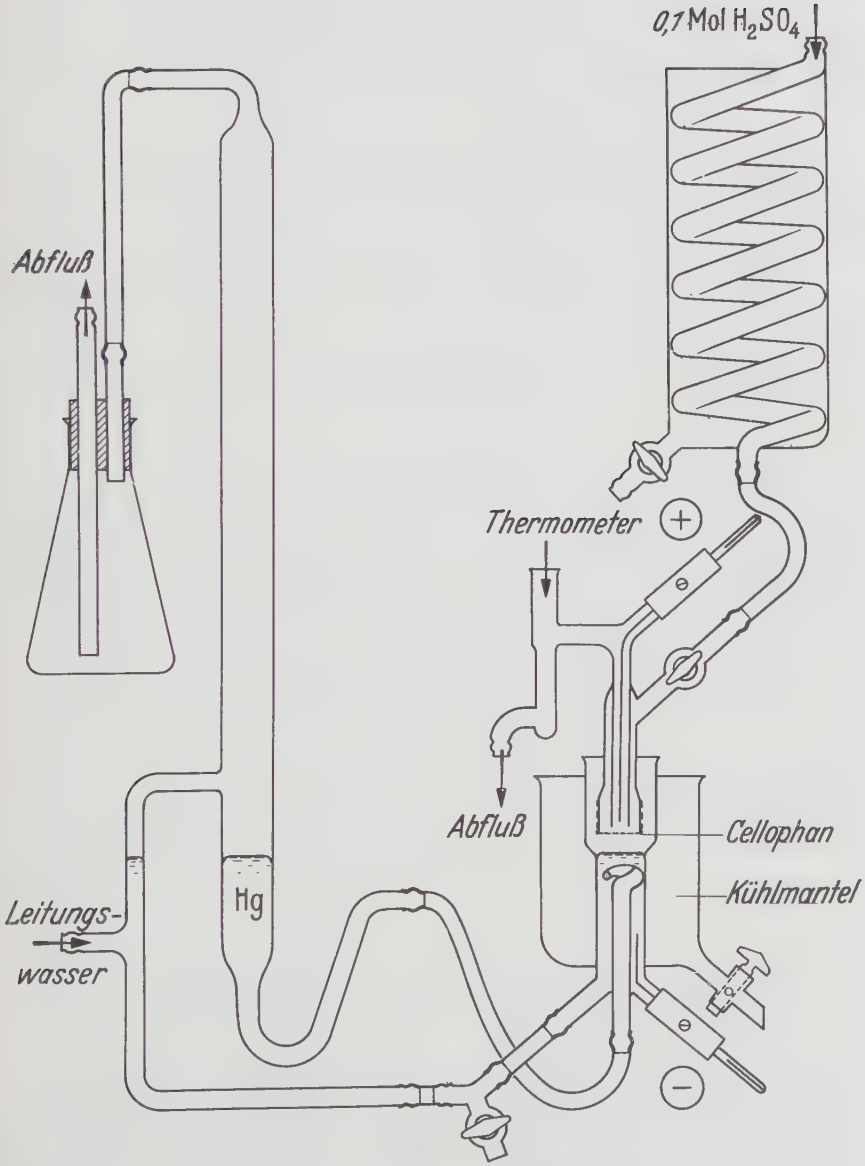

Abbildung 1: Entsalzungsapparatur nach ASTRUP, STAGE und OLSEN mit Kühlmantel.

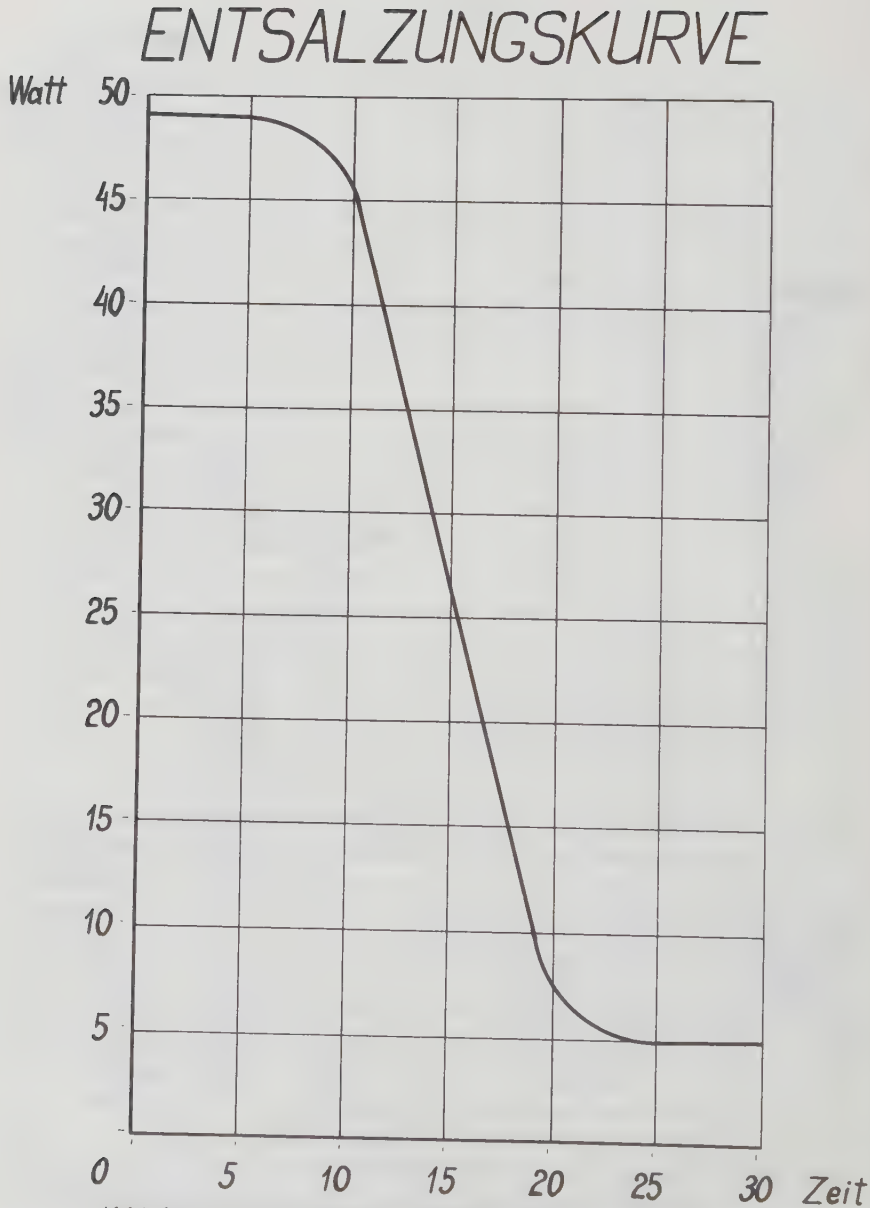

Abbildung 2: Stromabfall bei der Entsalzung von 10 ml enteiweißten Liquors.

Als Stromquelle ließen wir uns einen in mehreren Bereichen regelbaren Gleichrichter anfertigen, der eine Gleichspannung von 50 bis 300 V bei einer Stromstärke von 0, 1 bis 1, 5 A lieferte. Bei der Entsalzung verweilt der Stromfluß zunächst kurze Zeit auf einem durch die Leistungsfähigkeit des Gleichrichters und die Menge und Ionendichte der zu entsalzenden Lösung gegebenen Niveau, um dann langsam, schließlich mit zunehmender Erhöhung des elektrischen Widerstandes infolge fortschreitender Entsalzung, immer schneller abzusinken. Schließlich nähert er sich asymptotisch einem konstanten sehr niedrigen Endwert (Abb. 2). Infolgedessen werden in den ersten Minuten sehr viel, in weiteren Minuten immer weniger Ionen aus der Flüssigkeit entfernt. Bei der Entsalzung von 10 ml Liquor ist nach 20 Minuten zwar noch nicht der Endwert erreicht, die störenden Ionen sind dann jedoch aus der Flüssigkeit so weitgehend entfernt, daß einwandfreie Chromatogramme zu erzielen sind. Eine Fällung mit Silbernitrat läßt sich in der Flüssigkeit dann nicht mehr erzielen. Wir konnten uns daher immer mit dieser kurzen Entsalzungszeit zufrieden geben.

Eine Zerstörung oder Umwandlung einzelner Aminosäuren wird durch dieses schonende Vorgehen weitgehend vermieden. In Vorversuchen haben wir ein Gemisch von 39 Test-Aminosäuren und -Aminen zweimal eingewogen. Die erste Einwaage wurde mit destilliertem Wasser, die zweite mit Ringerlösung aufgenommen und in der oben beschriebenen Weise entsalzt. Sodann chromatographierten wir beide Testlösungen unter genau denselben Bedingungen. Die sich entsprechenden zweidimensionalen kombinierten Elektrophero-Chromatogramme waren dabei qualitativ, und soweit mit dem Auge feststellbar, auch quantitativ, in Intensität und Größe der einzelnen Flecke identisch.

Nach der Entsalzung wurde der Liquor erneut im Vacuum zur Trockene eingeengt und dann mit einem Hundertstel der ursprünglichen Flüssigkeitsmenge Aqua dest. aufgenommen (Einengungsverhältnis also 100 : 1). Diese Lösung wurde direkt zur Chromatographie verwandt.

B. Chromatographische bzw. hochspannungselektrophoretische Trennung der Liquoraminosäuren

Für die Hochspannungselektrophorese hatten wir eine Elektrophoresekammer nach WERNER u. WESTPHAL (78, 79) von den Ausmaßen 15 x 60 cm zur Verfügung. Es gelang uns trotz großer darauf verwendeter Mühe und Versuche mit verschiedensten Pufferlösungen im weiten Bereich von pH 1, 6 bis pH 10, 3 nicht, in einem Arbeitsgang sämtliche im Liquor vorhandenen Aminosäuren soweit zu

trennen, daß sie sicher identifiziert werden konnten. Ähnliche Erfahrungen machten bereits BAUER u. BOESCHE (6). Wir versuchten dann nach dem Vorgehen von DOSE und Mitarbeitern (18, 19) aus einem bei pH 6 angefertigten Pherogramm, einzelne Streifen herauszuschneiden, getrennt zu eluieren, die Eluate erneut einzuengen und bei anderem pH ein zweites Mal zu elektropherographieren. Dieses Verfahren erwies sich jedoch einmal als ziemlich zeitraubend und umständlich, außerdem traten dabei unvermeidliche kleine Verluste ein, die bei den sehr geringen Ausgangsmengen (5 ul des 100:1 eingeengten Liquors) schon dazu führten, daß einzelne im Liquor nur in ganz geringer Menge vorhandene Aminosäuren sich nicht oder nicht mehr konstant nachweisen ließen.

Wir haben dann versucht, die Trennung allein mit zweidimensionaler Papierchromatographie nach CONSDEN, GORDON u. MARTIN (12) zu bewerkstelligen. Dazu benutzten wir das Lösungsmittelpaar Isoamylalkohol, n-Butanol, Eisessig, Wasser (3:4:1:1) bzw. Pyridin, Eisessig, n-Butanol, Wasser (1:1:4:5) bzw. n-Butanol, Eisessig, Wasser (4:1:5) jeweils in Kombination mit o-Kresol, Phenol, Wasser (1:1:2). Bei der absteigenden Papierchromatographie können bekanntlich keine "Rf"-Werte ermittelt werden, da die Lösungsmittelfront als Bezugssystem wegfällt. Daher haben wir die Laufstrecken aller Testsubstanzen auf die Laufstrecke des Leucins bezogen und geben die entsprechenden Verhältniszahlen neben den "Rf"-Werten, als "R_L"-Werte an. Die Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die "R_F"-und "R_L"-Werte für die 39 Testsubstanzen bei den verwendeten Lösungsmitteln. Da es uns auch dabei nicht gelang, alle Flecke genügend weit und sicher aufzutrennen und wir den mit zweimaliger Papierchromatographie verbundenen Zeitaufwand vermeiden wollten, entschlossen wir uns dazu, Hochspannungselektrophorese und Papierchromatographie auf demselben Bogen miteinander zu kombinieren. Ein auf dem gleichen Prinzip beruhendes Verfahren wurde bereits von KICKHÖFEN und WESTPHAL (38) angegeben. Wir kamen schließlich zu

folgendem Standardvorgehen:

Ein 28 x 75 cm großer Filterpapierbogen (Abb. 3) (Schleicher u. Schüll 2043 a) wird mit der von KICKHÖFEN u. WESTPHAL (37) angegebenen Pufferlösung aus Ameisensäure, Eisessig, Wasser (1:3:16 - pH 1, 9) getränkt, die überschüssige Flüssigkeit mit einer Walzenpresse abgepreßt. Dann werden die in der Abbildung schraffierten Teile abgeschnitten und der Bogen in die Kammer so eingelegt, daß die seitliche Lasche (L) einseitig herausragt. Scharfe Knickungen dieser herausragenden Lasche müssen auch beim Schließen der Kammer vermieden werden, da sie sich auf die anschließende Papierchromatographie ungünstig auswirken. Dies ist durch Unterlagen mit geeignet zugeschnittenen Filterpapier-

Tabelle 2

Lösungsmittel / Substanz	Isoamylalkohol : 3 n-Butanol : 4 Eisessig : 1 Wasser : 1		Pyridin : 1 Eisessig : 1 n-Butanol : 4 Wasser : 5		n-Butanol : 4 Eisessig : 1 Wasser : 5		o-Kresol : 1 Phenol : 1 Wasser : 2	
	R_F	R_L	R_F	R_L	R_F	R_L	R_F	R_L
a-Alanin	0, 114	0, 315	0, 200	0, 381	0, 269	0, 437	0, 255	0, 391
b-Alanin	0, 111	0, 257	0, 211	0, 401	0, 303	0, 484	0, 298	0, 458
a-ABS	0, 211	0, 475	0, 275	0, 573	0, 331	0, 536	0, 432	0, 664
b-ABS	0, 117	0, 400	0, 255	0, 448	0, 279	0, 452	0, 478	0, 733
g-ABS	0, 118	0, 418	0, 275	0, 573	0, 319	0, 517	0, 549	0, 843
Arginin	0, 025	0, 057	0, 121	0, 232	0, 127	0, 205	0, 121	0, 186
Arterenol	0, 112	0, 286	0, 343	0, 652	0, 299	0, 500	0, 111	0, 117
Asparagin	0, 042	0, 087	0, 071	0, 136	0, 134	0, 216	0, 019	0, 030
Asparaginsäure	0, 050	0, 095	0, 078	0, 150	0, 134	0, 216	0, 029	0, 042
Citrullin	0, 055	0, 112	0, 125	0, 238	0, 162	0, 261	0, 302	0, 461
Cystein	0, 008	0, 019	0, 035	0, 068	0, 058	0, 094	0, 040	0, 061
Cystin	0, 008	0, 019	0, 032	0, 061	0, 065	0, 105	0, 040	0, 061
Glucosamin	0, 034	0, 086	0, 139	0. 265	0, 127	0, 205	0, 044	0, 068
Glutamin	0, 084	0, 191	0, 103	0, 197	0, 131	0, 210	0, 074	0, 142
Glutaminsäure	0, 088	0, 200	0, 121	0, 321	0, 200	0, 322	0, 082	0, 126
Glycyl-Glycin	0, 066	0, 114	0, 132	0, 252	0, 124	0, 200	0, 176	0, 271
Glykokoll	0, 067	0, 152	0, 160	0, 306	0, 193	0, 311	0, 153	0, 234
Histamin	0, 029	0, 067	0, 164	0, 313	0, 110	0, 177	0, 283	0, 451
Histidin	0, 016	0, 038	0, 103	0, 197	0, 100	0, 161	0, 227	0, 350
5-Hydroxy-Tryptam.	0, 116	0, 360	0, 396	0, 755	0, 445	0, 717	0, 509	0, 783
Isoleucin	0, 414	0, 963	0, 500	0, 952	0, 586	0, 945	0, 643	0, 988
Leucin	0, 443	1, 000	0, 525	1, 000	0, 621	1, 000	0, 651	1, 000
Lysin	0, 016	0, 038	0, 093	0, 177	0, 103	0, 166	0, 042	0, 065
Methionin	0, 279	0, 660	0, 376	0, 714	0, 441	0, 711	0, 612	0, 939
Norvalin	0, 334	0, 752	0, 415	0, 790	0, 500	0, 805	0, 562	0, 862
Ornithin	0, 016	0, 038	0, 100	0, 190	0, 117	0, 189	0, 039	0, 060
Oxyprolin	0, 067	0, 152	0, 159	0, 292	0, 138	0, 222	0, 400	0, 616
Panthenol	0, 118	0, 409	0, 293	0, 557	0, 328	0, 527	0, 651	1, 000
Phenylalanin	0, 397	0, 895	0, 485	0, 925	0, 524	0, 843	0, 716	1, 100
Prolin	0, 115	0, 353	0, 241	0, 433	0, 234	0, 378	0, 753	1, 152
Sarkosin	0, 101	0, 228	0, 186	0, 354	0, 251	0, 405	0, 533	0, 819
Serin	0, 050	0, 095	0, 107	0, 204	0, 148	0, 238	0, 105	0, 162
Taurin	0, 042	0, 087	0, 100	0, 190	0, 134	0, 216	0, 149	0, 227
Threonin	0, 088	0, 200	0, 156	0, 286	0, 193	0, 313	0, 184	0, 283
Tryptamin	0, 418	0, 982	0, 685	1, 310	0, 655	1, 055	0, 748	1, 148
Tryptophan	0, 266	0, 600	0, 396	0, 755	0, 431	0, 695	0, 565	0, 867
Tyramin	0, 342	0, 773	0, 590	1, 120	0, 565	0, 910	0, 537	0, 826
Tyrosin	0, 203	0, 457	0, 300	0, 571	0, 321	0, 516	0, 369	0, 481
Valin	0, 296	0, 667	0, 358	0, 681	0, 441	0, 711	0, 529	0, 814

Tabelle 2. Die "R_F"- und die "R_L"- Werte für die 39 verwendeten Testsubstanzen.

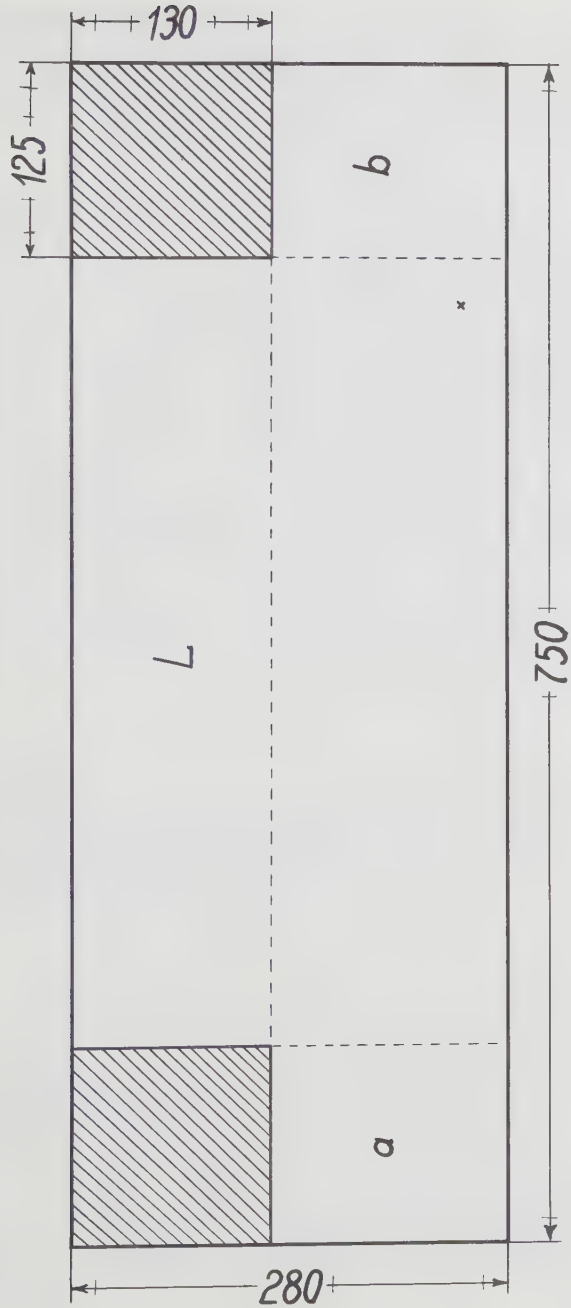

Abbildung 3: Erläuterung siehe Text. x - Auftragstelle.

streifen zu erreichen. Es gelingt dadurch, einwandfreie Elektrophero-Chromatogramme zu erzielen, obwohl die Elektrophoresekammer nach WERNER u. WESTPHAL (78, 79) wegen ihrer geringen Breite für kombinierte Elektrophero-Chromatogramme im Vergleich zu der fast quadratischen Kammer nach WIELAND u. PFLEIDERER (80) weniger geeignet ist.

Mit einer Mikropipette wurden 5 ul des 100 : 1 eingeengten Liquors (also entsprechend 0,5 ml Nativliquor) an der mit x bezeichneten Stelle punktförmig aufgetragen. Die anschließende Elektrophorese wurde 75 Minuten mit einer Stromstärke von 5 000 bis 6 000 Volt (80 - 100 V/cm) durchgeführt. Danach wurde das Papier der Kammer entnommen, die auf der Abbildung mit (a) und (b) bezeichneten Teile abgetrennt und zusammen mit dem verbleibenden Restbogen bei 75° C im Trockenschrank getrocknet. Vorher mußte jedoch die Lasche (L), die während der Elektrophorese seitlich aus der Kammer herausragte, und daher bereits getrocknet war, erneut mit der Pufferlösung befeuchtet werden, um dann ein gleichmäßiges und faltenfreies Trocknen des verbleibenden Bogens zu erreichen. Anschließend wurde der Bogen senkrecht zur elektrophoretischen Trennrichtung in n-Butanol, Eisessig, Wasser (4:1:5) 16 Stunden aufsteigend chromatographiert. Diese Methode erlaubte uns eine vollständige Auftrennung aller in einem Testgemisch vorhandenen 39 Substanzen und hat sich auch bei der Trennung der Liquoraminosäuren hervorragend bewährt.

C. Färbverfahren

Meist verwendet wurde die Ninhydrinfärbung nach LEVY u. CHUNG (40), da mit ihr eine sehr kräftige und mannigfaltige Anfärbung der einzelnen Aminosäuren zu erreichen ist, die eine sofortige Identifizierung der verschiedenen Flecke erlaubt. Bei der erreichten weitgehenden Trennung erübrigte sich daher in den meisten Fällen die routinemäßige Anwendung der anderen Färbungen. Nur zum Nachweis der Aminosäuren Prolin, Methionin, Cystin und Phenylalanin, die sich mit Ninhydrin ziemlich schwach anfärben und wegen ihrer geringen Konzentration im Liquor nicht immer mit der LEVY-CHUNG-Färbung sicher nachweisbar waren, bedienten wir uns in allen Fällen noch gewisser für diese Stoffe spezifischer Färbungen. Für Prolin wurde die Isatinfärbung nach BARROLLIER (4) bevorzugt, für Methionin und Cystin wurde die Färbung mit Platintetrachlorid und Natriumjodid verwendet (TURBA /70/). Phenylalanin wurde mit der empfindlichen Reaktion nach PASIEKA u. MORGAN (51, 52) nachgewiesen. Wir mußten jedoch zum sicheren Nachweis dieser schwer färbbaren Säuren bis zu 30 ul des 100 : 1 eingeengten Liquors (also 3 ml Nativ-

liquor) auftragen. Die Reaktionen wurden auf eigens zum Nachweis der betreffenden Aminosäuren angefertigten eindimensionalen Papierchromatogrammen und Elektropherogrammen durchgeführt. Um die Anfärbung der eindimensionalen Elektropherogramme mit sechs verschiedenen spezifischen Reagenzien ohne Zerschneidung der Papierstreifen durchführen zu können, fertigten wir aus einem Röntgenfilm eine verschiebbare Schablone an (Abb. 4), die uns dieses Verfahren erleichterte.

In einigen Fällen bedienten wir uns darüber hinaus der Ninhydrinfärbungen nach BRÜGGEMANN u. DREPPER (10), nach KAWERAU u. WIELAND (31), nach HEILMANN u. Mitarb. (25) und nach BODE (7), weiter der FOLIN-Färbung (21) mit 1, 2-Naphtochinon-4-Sulfonsaurem Natrium in der Modifikation nach GIRI u. NAGABHUSHANAM (22) oder nach BARROLLIER (4), außerdem der Färbung mit dem Triketopiperidinderivat (Reagenz Sä 1649) nach HEFFE (24) und der Isatinfärbung nach ACHER (1).

Alle Chromatogramme wurden nach der Färbung auch im UV - Licht untersucht. Die Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die Fluoreszenz und Farbtönung aller Testsubstanzen bei den verwendeten Farbreagenzien.

Mit der oben beschriebenen Methodik wurden 20 Liquores untersucht. Weitere 10 Liquores, die wir vorher untersucht hatten, lassen wir unberücksichtigt, da wir bei ihnen entweder nicht sicher sind, daß die Aufarbeitung völlig schonend und ohne jede denkbare Zerstörung oder Umwandlung der einzelnen Substanzen erfolgt ist, oder bei denen wir - gemessen an unseren späteren Erfahrungen - nur mangelhafte Chromatogramme erreichten. Diese könnten zu Fehldeutungen Anlaß geben, vor allem im Hinblick auf das Vorkommen der nur in geringer Konzentration vorhandenen Substanzen, die sich bei nicht einwandfreier Trennung dem Nachweis entziehen.

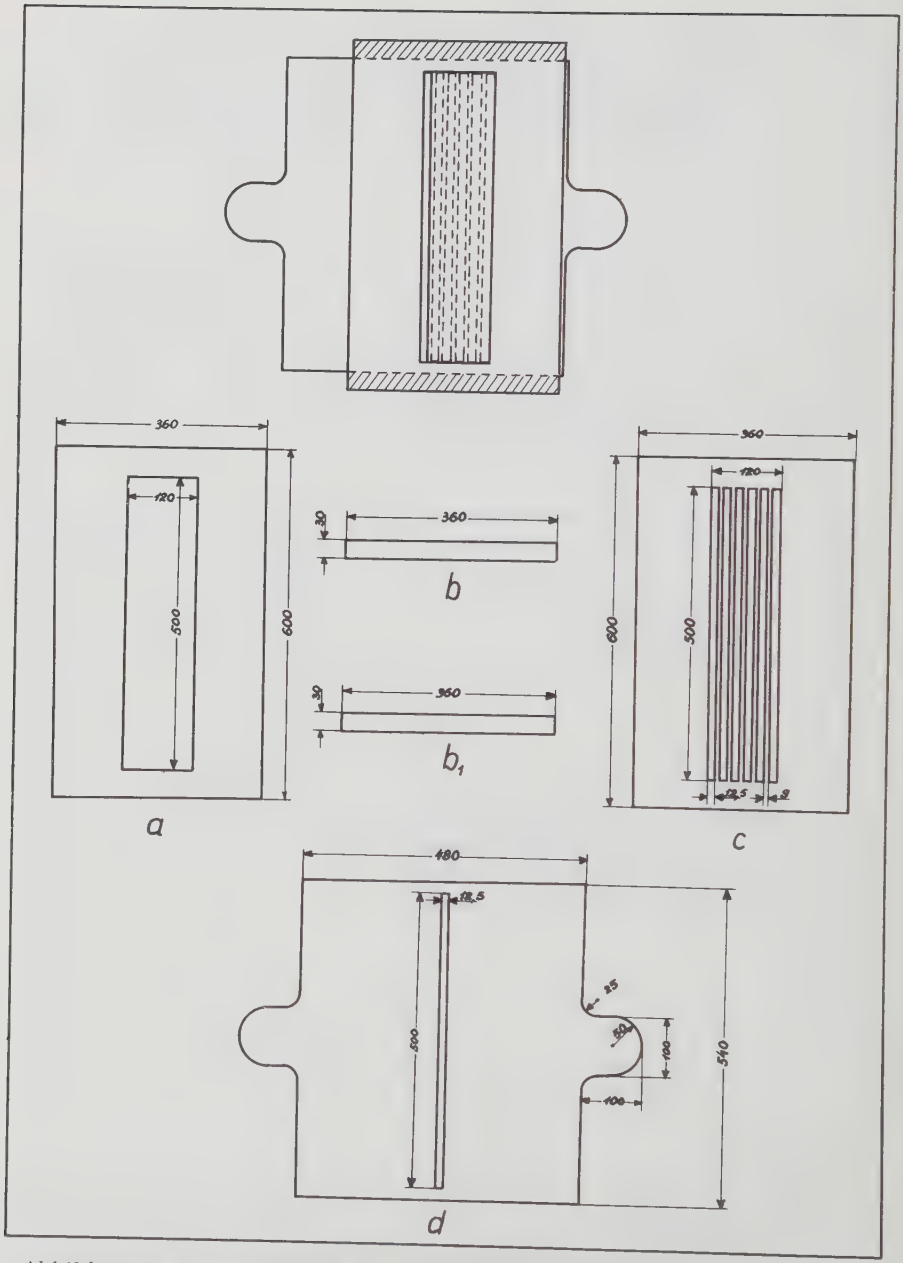

Abbildung 4: Eine Schablone zur Anfärbung der eindimensionalen Elektropherogramme mit sechs verschiedenen Farbreaktionen.

Tabelle 3

Färbung	mit Ninhydrin nach LEVY u. CHUNG		mit 1, 2-Naphtochinon-4-Sulfonsaurem Natrium				mit Reagenz Sä 1649 nach HEFFE		mit Insatin nach BARROLLIER		mit spezifischen Reagenzien	
			nach GIRI u. NAGABHUSHANAM		nach BARROLLIER							
Substanz	Tageslicht	UV	Tageslicht	UV	Tageslicht	UV	Tageslicht	UV	Tageslicht	UV	Reagenz	Farbe
a-Alanin	violett	-	blaugrau	-	grün	grün	grün	-	rosa	-		
b-Alanin	dkl. blau	-	viol.	-	dkl. grün	-	grün	viol.	blassblau	-		
a-ABS	viol.	-	blaugrau	-	grüngrau	-	grün	-	blassrosa	-		
b-ABS	viol.	-	blaugrau	-	grüngrau	-	grün	-	blassrosa	-		
g-ABS	viol.	-	blaugrau	-	grüngrau	-	grün	-	blassrosa	-		
Arginin	viol.	-	bräunl. grau	-	grün	-	grün	-	-	-		
Arterenol	rötl.-barun	-	graugrün	-	dkl. blau	-	viol.	-	rot	-		
Asparagin	hellblau	-	grau	-	grün	-	grün	viol.	-	-		
Asparaginsäure	hellblau	-	grauviol.	-	grün	-	grün	-	blassblau	-		
Citrullin	grauviol.	-	bräunl.-grau	-	blassgrün	-	grün	-	blassviol.	-	Ehrlich's Aldehyd	zitr. gelb
Cystein	hellbraun	-	hellbraun	-	braun	dkl. gelb	braungrau	-	rosa	-	$PtCl_4$ NaJ	gelb auf
Cystin	braungrau	-	braungrau	-	braun	blassrosa	braunviol.	-	rotbraun	-	"	lila Untgr.
Glucosamin	grau	-	blaugrau	hellblau	blauviol.	graugrün	rosa	rosa	rosa	-		
Glutamin	dkl. viol.	-	grau	-	grün	hellbraun	grün	-	blassrosa	-		
Glutaminsäure	viol.	-	grau	-	grün	hellbraun	grün	-	blassrosa	-		
Glycyl-Glycin	gelb	-	grasgrün	-	orange	orange	zitr. gelb	zitr. gelb	dkl. viol.	-		
Glykokoll	rotviol.	-	graugrün	gelb	gelbgrün	zitr. gelb	oliv. grün	gelb	blassrosa	-		
Histamin	braungrau	grün	grauviol.	-	dkl. viol.	-	braungrau	rot	graubraun	-		
Histidin	hellbraun	-	braungrau	-	viol.	-	hellbraun	rosa	grau	-	Pauly's Diazorg	kirschrot
5-Hydroxy-Tryptamin	grau	-	braungrau	-	grauviol.	hellbraun	dkl. blau	-	rosa	-		
Isoleucin	viol.	-	grau-rosa	-	blaugrau	-	grün	-	blassrosa	-		
Leucin	viol.	-	grau-rosa	-	grün	grün	grün	-	blassrosa	-		
Lysin	viol.	-	taub.-grau	-	dkl. grün	-	braungrün	orange	blassrosa	-		
Methionin	viol.	-	hellbraun	-	grün	rötl. braun	braungrau	-	blassrosa	-	$PtCl_4$ NaJ	gelb

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Färbung / Substanz	mit Ninhydrin nach LEVY u. CHUNG		mit 1, 2-Naphtochinon-4-Sulfonsaurem Natrium nach GIRI u. NAGABHUSHANAM		mit 1, 2-Naphtochinon-4-Sulfonsaurem Natrium nach BARROLLIER		mit Reagenz Sä 1649 nach HEFFE		mit Insatin nach BARROLLIER		mit spezifischen Reagenzien	
	Tageslicht	UV	Tageslicht	UV	Tageslicht	UV	Tageslicht	UV	Tageslicht	UV	Reagenz	Farbe
Norvalin	viol.	-	rosa-braun	-	grün	grün	grün	-	rosa	-		
Ornithin	grau-viol.	-	taub.-grau	-	dkl. grün	-	grau	-	blau-grau	-		
Oxyprolin	gelb	-	rosa	-	bräunl. rot	-	blass-grün	-	hell-blau	-	Isatin	blau
Panthenol	hell-viol.	-	grau-blau	-	blau-grau	-	grün	-	blass-viol.	-		
Phenylalanin	grau-braun	-	rosa	-	grün	-	braun-grün	-	blass-viol.	-	nach PASIEKA	blau
Prolin	zitr. gelb	-	rosa	-	braun-rot	-	gelb-grün	rosa	dkl. blau	-	Isatin	blau
Sarkosin	rosa-viol.	-	rosa	-	blau-grün	-	grün	-	blass-rosa	-		
Serin	grau	-	grün-grau	-	blau-grau	grün	oliv. grün	-	blass-rosa	-		
Taurin	dkl. viol.	-	braun-grau	-	blau	-	grün	blau	viol.-blau	-		
Threonin	grau-grün	-	hell-braun	-	grün	-	grün	-	blass-rosa	-		
Tryptamin	braun	grün	grau-viol.	dkl. blau	viol.	dkl. rot	dkl. viol.	-	braun-rot	-		
Tryptophan	braun-viol.	-	rot-viol.	-	grün	-	viol.	-	rosa	-	EHRLICHS Aldehyd	viol.
Tyramin	grau-braun	grün	braun-grau	dkl. grün	viol.	viol.	dkl. rot	-	hell-braun	-		
Tyrosin	braun-grau	-	rot-viol.	-	grün	-	rosa-rot	-	blass-rosa	-	Pauly's Diazo.	rot
Valin	viol.	-	rosa-braun	-	grau-blau	-	grün	-	blass-rosa	-		

Tabelle 3: Übersicht über die Anfärbung der Testsubstanzen mit verschiedenen differenzierten und spezifischen Reagenzien sowie die Fluoreszenz der Flecke im UV - Licht.

IV. ERGEBNISSE

A: Kombinierte elektropherographisch-chromatographische Trennung von Testgemischen

Da die Entwicklung und Darstellung der Methodik im Rahmen dieser Arbeit von wesentlicher Bedeutung ist, wollen wir zunächst kurz auf unsere Ergebnisse bei der Auftrennung von künstlich zusammengestellten Aminosäuregemischen eingehen.

Das Verhalten folgender Stoffe wurde bei verschiedensten Bedingungen geprüft: a-Alanin, b-Alanin, a-Amino-n-Buttersäure, b-Amino-n-Buttersäure, g-Amino-n-Buttersäure, Arginin, Arterenol, Asparagin, Asparaginsäure, Citrullin, Cystein, Cystin, Glucosamin, Glutamin, Glutaminsäure, Glycyl-Glycin, Glykokoll, Histamin, Histidin, 5-Hydroxy-Tryptamin (Serotonin), Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Norvalin, Ornithin, Oxyprolin, Panthenol, Phenylalanin, Prolin, Sarkosin, Serin, Taurin, Threonin, Tryptamin, Tryptophan, Tyramin, Tyrosin und Valin. Fast alle diese Substanzen wurden in 0,1 %iger wässeriger oder schwach salzsaurer Lösung verwandt. Histidin wurde in 0,3 %, die Amine in 0,5 %, Arterenol und Panthenol in 1 % Lösung verwendet, da diese Stoffe mit Ninhydrin eine schwächere Färbung geben. Aufgetragen wurden jeweils 5 ul, also etwa 5 ugr Substanz.

Bei der Hochspannungselektrophorese ordneten sich diese Stoffe je nach dem pH der verwendeten Pufferlösung in verschiedenen Banden (Abb. 5). Tabelle 4 erläutert die in Abbildung 5 dargestellten Banden. Wie man sieht, gelingt es bei der in unserer Apparatur höchstmöglichen Trennungslänge von 55 cm in keinem pH-Bereich, sämtliche verwendeten Aminosäuren so weit zu trennen, daß alle mit Sicherheit nach diesem einen Arbeitsgang identifiziert werden können. Überschneidungen kommen vor allem bei der Gruppe der neutralen Aminosäuren vor. Am besten geeignet erwies sich uns die Trennung bei pH 1,9 mit dem von KICKHÖFEN u. WESTPHAL (37) angegebenen Puffer aus Ameisensäure, Eisessig, Wasser (1:3:16), bei dem die Gruppe der sonst einheitlich wandernden neutralen Aminosäuren in mehrere Banden getrennt wird. Die anderen Puffer wurden fernerhin nur noch zu Spezialaufgaben eingesetzt. So wurde zur isolierten Abtrennung von Glutaminsäure und Asparaginsäure der Puffer nach MICHL (45) aus Pyridin, Eisessig, Wasser (1:10:90) - pH 3,6 bzw. (10:1:89) - pH 6 herangezogen. Mit dem von DOSE u. CAPUTO (18) angegebenen Puffer aus Ammoniumcarbonat, 5n Ammoniak, Wasser (pH 10) erzielten wir nur ziemlich unscharfe und verwaschene Banden, die für unsere Untersuchung nicht ausreichten.

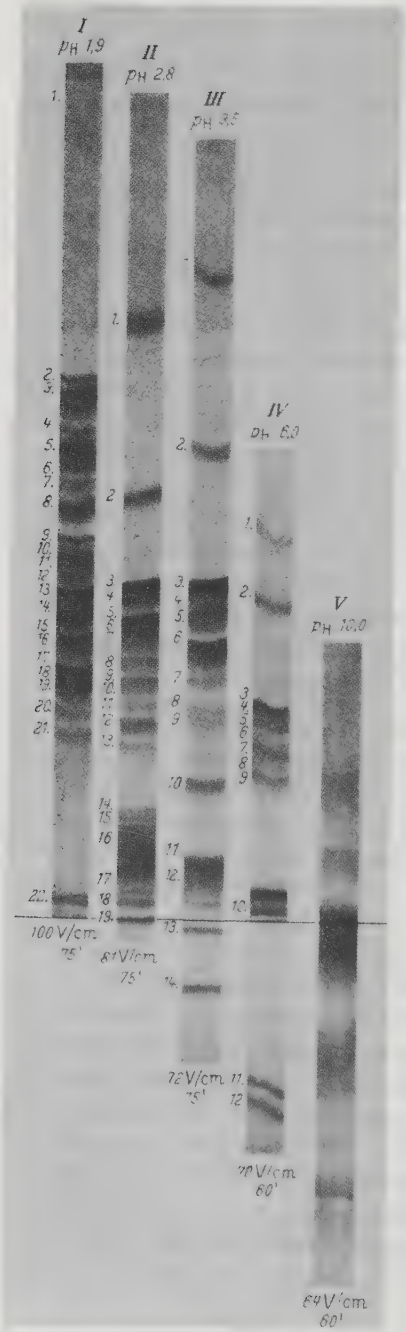

Abbildung 5: Anordnung verschiedener als Teststoffe gebrauchter Ninhydrinfärbbarer Substanzen nach hochspannungselektrophoretischer Trennung bei verschiedenen pH-Werten. (Vergl. Tab. 4). Der waagrechte Strich stellt die Auftragslinie dar.

Tabelle 4

Bande	I pH 1,9 Ameisensäure Eisessig Wasser (1:3:16) 100 V/cm, 75 Min.	II pH 2,8 Pyridin Ameisensäure Eisessig Wasser (2:3:20:180) 81 V/cm, 75 Min.	III pH 3,6 Pyridin Eisessig Wasser (1:10:90) 72 V/cm, 75 Min.	IV pH 6 Pyridin Eisessig Wasser (10:1:89) 70 V/cm, 60 Min.	V pH 10 Ammoniuncarb. 5n-Ammoniak Wasser ca (1:8:200) 64 V/cm, 60 Min
1.	Histamin	Histamin	Histamin	Histamin	Unscharf getrennte und verwaschene Banden.
2.	Panthenol	Panthenol	Panthenol	Panthenol	
3.	Ornithin, Lysin	b-ABS, g-ABS	Ornithin	Ornithin	
4.	b-Alanin	b-Alanin	Tyramin	Tryptamin, Tyramin	
5.	b-ABS, g-ABS	Ornithin	Lysin, Histidin	Lysin	
6.	Arginin	Lysin, Histidin	b-Alanin, Arginin, Tryptamin, Glucosamin	Histidin, Arterenol	
7.	Histidin	Tyramin	Arterenol	Arginin, Glucosamin	
8.	Glykokoll	Arginin	b-ABS, g-ABS	Serotonin	
9.	Glycil-Glycin	Tryptamin	Serotonin		
10.	Tyramin	Glucosamin	Glycil-Glycin	26 Testsubst.	
11.	a-Alanin	Arterenol	Glykokoll	Glutaminsäure	
12.	Sarkosin	Glycil-Glycin	Neutr. Aminosäur. (22 versch. Testsubstanzen)	Asparaginsäure	
13.	a-ABS, Tryptamin	Serotonin	Glutaminsäure		
14.	Valin, Norvalin, Glucosamin	Glykokoll	Asparaginsäure		
15.	Leucin, Isoleucin, Serin, Arterenol	a-Alanin			
16.	Threonin, Prolin, Methionin, Cystein	Gruppe der neutr. Aminosäuren (19 versch. Testsubst.)			
17.	Glutamin, Glutaminsäure, Citrullin, Phenylalanin, Serotonin	Cystein			
18.	Cystin	Glutaminsäure			
19.	Asparagin, Asparaginsäure, Oxyprolin	Asparaginsäure			
20.	Tyrosin				
21.	Tryptophan				
22.	Taurin				

Tabelle 4 Anordnung verschiedenen, als Teststoffe gebrauchter Ninhydrinfärbbarer Substanzen nach hochspannungselektrophoretischer Trennung bei verschiedenen pH-Werten (vergl. Abb. 5).

Wir suchten nun für die anschließende Papierchromatographie nach einem Lösungsmittel, das die bei der Hochspannungselektrophorese bei pH 1, 9 ungenügend getrennten Aminosäuren weiter gut auftrennte. Zu diesem Zweck erprobten wir die oben angegebenen Entwicklungsgemische, von denen sich das Gemisch n-Butanol, Eisessig, Wasser (4:1:5) am besten eignete. Gerade die bei der Hochspannungselektrophorese schlecht getrennten Aminosäuren der Banden 13 bis 19 (Tab. 4) trennen sich mit diesem Gemisch besonders gut. Die einzelnen Substanzen ordnen sich in dem resultierenden zweidimensionalen Elektrophero-Chromatogramm wie in Abbildung 6 gezeigt an.

Die Abbildung zeigt ein kombiniertes Originalchromatogramm, bei dem sämtliche 39 als Testsubstanzen verwendeten Stoffe gut getrennt zur Darstellung kommen. Die wenigen, auch darin noch vorhandenen Überschneidungen einzelner Substanzen stören nicht, da sich diese am frischen Chromatogramm leicht und sicher auf Grund ihrer verschiedenen Anfärbbarkeit mit der sehr differenten Ninhydrinfärbung von LEVY u. CHUNG (40) unterscheiden lassen.

B. Ergebnisse bei der Auftrennung der Liquoraminosäuren

Nach dem geschilderten Vorgehen wurden 20 verschiedene Liquores untersucht. Ein repräsentatives Elektrophero-Chromatogramm zeigt die Abbildung 7.

Der Liquor stammt von einem Fall von leichtem Diabetes insipidus ohne sonstigen krankhaften Organbefund und war bei den üblichen klinischen Liquoruntersuchungen (Farbe, Zellzahl, Pandy, Kafka, Normo-Mastixkurve) völlig unauffällig. Ganz ähnliche Elektrophero-Chromatogramme erhielten wir bei sämtlichen mit der geschilderten Methode untersuchten Fällen.

In unseren nach LEVY und CHUNG mit Ninhydrin gefärbten Elektrophero-Chromatogrammen kamen meistens 25 verschiedene Flecken zum Vorschein, von denen regelmäßig 20 identifiziert werden konnten. Sie entsprachen folgenden Substanzen: Alanin, a-Amino-n-Buttersäure, g-Amino-n-Buttersäure, Arginin, Asparaginsäure, Glutamin, Glutaminsäure, Glykokoll, Histidin, Leucin/Isoleucin, Lysin, Methionin, Ornithin, Phenylalanin, Serin, Taurin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin und Valin. Die stärksten Flecke werden durch Glutamin, ferner mit Abstand - durch Alanin, Valin und die Leucine hervorgerufen. Am schwächsten kommt der Fleck der g-Amino-n-Buttersäure heraus. Jedoch war er, wenigstens angedeutet, in allen Elektrophero-Chromatogrammen vorhanden. Auch Methionin, Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan geben bei der geschilderten Technik oft nur sehr schwache Flecke.

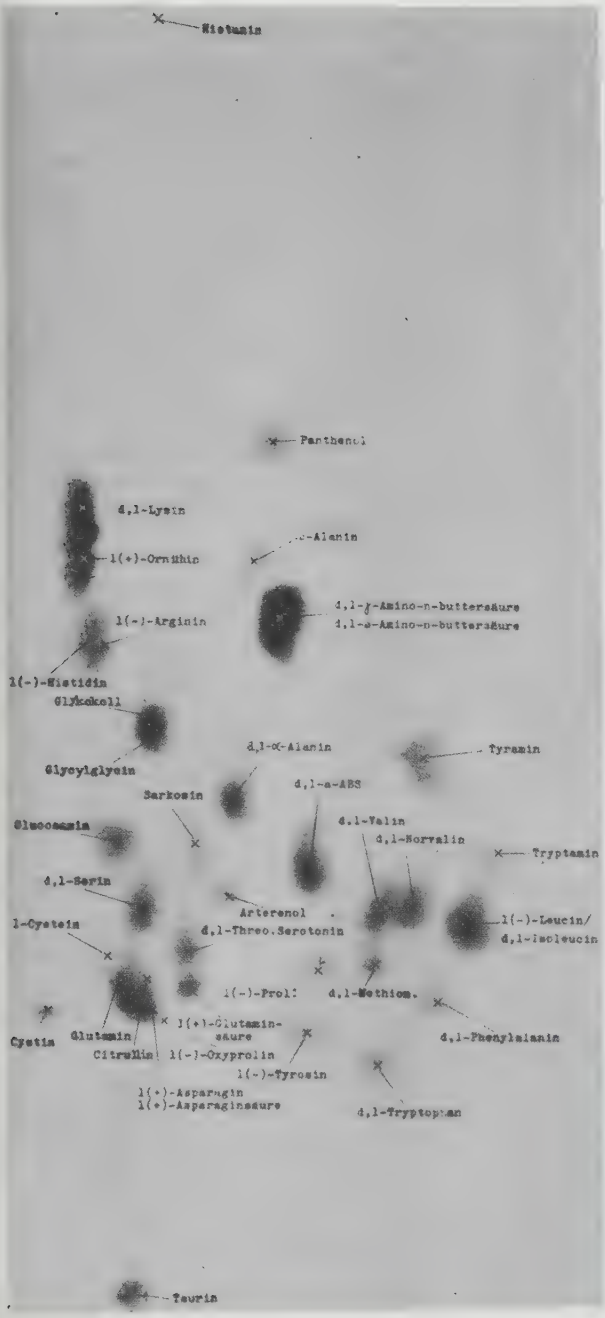

Abbildung 6:
Kombiniertes Elektropherо-Chromatogramm, das die Auftrennung von 39 Ninhydrin-färbbaren Substanzen (jeweils ca. 3,5 ug) zeigt. HE 100 V/cm, 75 Minuten bei pH 1,9 mit anschließender Papierchromatographie während 16 Stunden in n-Butanol, Eisessig, Wasser (4:1:5). Färbung nach LEVY und CHUNG.
(Die phototechnisch mangelhaft ausgeleuchtete schwarz-weiß Aufnahme kann keinen Eindruck von der Brillianz der verschiedenen Farbtöne vermitteln.)

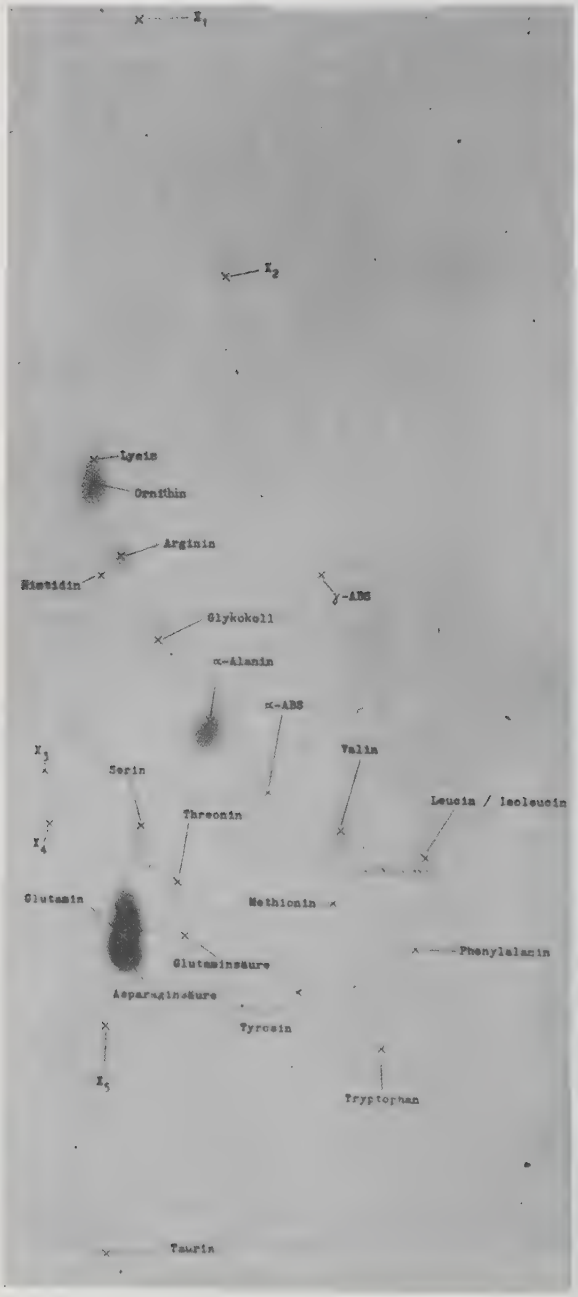

Abbildung 7:
Kombiniertes Elektrophero-Chromatogramm von 0,5 ml Liquor cerebrospinalis.
Technik wie bei Abb. 6.

Wir fertigten daher zur isolierten Identifizierung dieser Substanzen von allen Liquores eindimensionale Chromatogramme und Elektropherogramme an, bei denen wir jeweils 2 bis 3 ml Liquor auftrugen und die Chromatogramme bzw. Elektropherogramme mit spezifischen Farbreaktionen färbten. Die Aminosäuren Prolin und Cystein/Cystin konnten dadurch ebenfalls in allen Liquores identifiziert werden. Die Zahl der regelmäßig sicher nachgewiesenen und identifizierten Substanzen erhöhte sich damit auf 22. Auf dem kombinierten Elektrophero-Chromatogramm waren dagegen Prolin und Cystein/Cystin wegen ihrer schwachen Anfärbbarkeit mit Ninhydrin nicht auffindbar. Daher gelang auch die im zweidimensionalen Elektrophero-Chromatogramm bei Testsubstanzen sehr gut mögliche Auftrennung von Cystein und Cystin nicht. In dem von uns verwendeten Lösungsmittelgemisch von n-Butanol, Eisessig, Wasser (4:1:5) entstand immer auf den eindimensionalen, aufsteigenden Chromatogrammen nur ein einziger ziemlich großer Fleck für Cystein und Cystin. Weitere Versuche zur Trennung dieser Substanzen, etwa mit anderen Lösungsmitteln, wurden nicht unternommen. Auch wurde nicht versucht, den Komplex Leucin-Isoleucin in seine Komponenten zu zerlegen. Der auf der Abbildung 7 im Schwarz-weiß-Bild von dem intensiven Glutaminflecken nicht abgrenzbare Fleck der Asparaginsäure konnte auf den frischen Elektrophero-Chromatogrammen leicht durch seinen leuchtend hellblauen Farbton unterschieden werden. Bei einigen Liquores führten wir dazu noch Elektropherogramme bei pH 6 aus, bei denen sich die Asparaginsäure und die Glutaminsäure scharf von den übrigen Komponenten des Gemisches trennen. Auch der dem Lysinfleck eng benachbarte Ornithinfleck unterscheidet sich auf dem frischen Elektrophero-Chromatogramm von diesem durch seinen etwas ins graue spielenden Farbton.

Von den in der Abbildung 7 mit X bezeichneten Flecken, sind die Flecken X_1, X_2 und X_5 konstant bei allen Liquores nachweisbar. Bei X_1 und X_2 handelt es sich sicher um biogene Amine, da bei dem verwendeten Puffer von pH 1, 9 nur stark basische Substanzen derartige, die basischen Aminosäuren weit übertreffenden Laufstrecken haben. Die Position von X_1 entspricht etwa derjenigen von Histamin. Wir glauben jedoch nicht, daß es sich bei dem Flecken X_1 um diese Substanz handeln muß, da die physiologischerweise im Liquor vorkommenden Histaminmengen zu gering sind, als daß sie mit der beschriebenen Methodik nachweisbar sein könnten. Alle drei Flecken (X_1 X_2 und X_5) werden sicher nicht durch Peptide verursacht, da sie auch nach 24-stündiger Hydrolyse mit 6n-HCl bei 100° C noch unverändert nachgewiesen werden können. Weitere Versuche zu ihrer Identifizierung wurden nicht unternommen. Die beiden nicht in allen Elektrophero-Chromatogrammen vorhandenen Flecken X_3 und X_4 werden dagegen wahrscheinlich durch niedere Peptide verursacht. Sie verschwinden nach Hydrolyse.

V. DISKUSSION

Ziel unserer Arbeit war die Klärung der Frage, welche Aminosäuren im Liquor cerebrospinalis regelmäßig vorkommen. Die bisher vorliegende Literatur gibt ziemlich widersprechende Ergebnisse.

LOGOTHETIS (41), der bisher über das größte Material verfügt, fand 8 Aminosäuren (Alanin, Asparaginsäure, Glutamin, Glutaminsäure, Glycin, Leucin, Serin und Valin) fast regelmäßig (in über 85 % der Fälle), weitere 10 Aminosäuren (a-Amino-Buttersäure, g-Amino-Buttersäure, Arginin, Cystin, Histidin, Lysin, Phenylalanin, Prolin, Threonin und Tyrosin) weniger häufig. SOLOMON und Mitarbeiter (64) mußten ihre Untersuchungen aus methodischen Gründen auf 10 Säuren, Arginin, Cystin/Cystein, Histidin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Threonin, Tyrosin und Valin beschränken. Von diesen konnten Methionin und Cystin nicht regelmäßig nachgewiesen werden. BOULANGER (8) identifizierte 7 verschiedene Säuren (Alanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glycin, Leucin, Serin und Valin), POND (54) und REITMAN (55) je 6 Aminosäuren und zwar beide Alanin, Glutamin, Glutaminsäure, Glycin und Valin, ersterer dazu Leucin, letzterer dagegen Tryptophan. KEMALI (33, 34, 35, 36) und TORRE (69) konnten 11 bzw. 12 und WALKER, TELLES u. PASTORE (75) sogar 16 Aminosäuren auffinden, jedoch werden wieder z. T. verschiedene Säuren gefunden, so daß die Angaben für a- und g-Amino-Buttersäure, für Asparaginsäure, für Cystin, für Lysin, für Tryptophan, ja sogar für Glutamin, die wichtigste Liquoraminosäure, widersprechen. Dazu werden die meisten dieser Säuren nur in wenigen Fällen oder sogar nur ein einziges Mal sicher nachgewiesen. SCHÖNENBERG (59) schreibt in einer Arbeit aus dem Jahre 1953, er könne nur Alanin, Leucin und Lysin regelmäßig finden. In einer späteren Arbeit 1954 (60) kommen Glutamin, Serin und Valin hinzu. 1956 (62) weist er noch Histidin und Glutaminsäure nach, betont jedoch ausdrücklich, dies glücke nur in vereinzelten Fällen. BAUER u. BOESCHE (6) zählen Alanin, Glutamin, Glutaminsäure, Glycin, Leucin, Phenylalanin, Serin, Threonin, Tyrosin und Valin zu den fast regelmäßig im Liquor vorkommenden Aminosäuren.

Bei Durchsicht dieser Arbeiten, deren Zahl man noch um einige weitere vermehren könnte, ergibt sich für uns die Frage: Erklären sich diese Unterschiede in der Art und Zahl der regelmäßig nachweisbaren Aminosäuren allein durch Unvollkommenheit der jeweils verwendeten Methodik, oder sind sie durch den Untersuchungsstoff selbst bedingt, - beruhen sie also auf erheblichen Schwankungen in der Zusammensetzung des normalen Liquor cerebrospinalis? Wäre dies der Fall, ergäbe sich die weitere Frage, ob das Vorhandensein oder Nichtvor-

handensein bestimmter Aminosäuren charakteristisch ist für bestimmte Erkrankungen, wie dies auch von einigen Autoren zur Diskussion gestellt wird (LOGOTHETIS /41/, REITMAN /55/, SCHÖNENBERG /62/ u.a.).

Wir selbst konnten mit unserer oben beschriebenen Methodik im Liquor regelmäßig 25 ninhydrinpositive Substanzen finden, von denen 22 sicher identifiziert wurden, nämlich 21 verschiedene Aminosäuren und Taurin, ein Aminosäurespaltprodukt. Dazu kommen regelmäßig drei andere Stoffe, von denen 2 wahrscheinlich Amine sind, und in einigen Fällen zwei verschiedene, ebenfalls auf dem Elektrophero-Chromatogramm immer an derselben Stelle sitzende, also definierte Peptide. Die 20 in einer Serie hintereinander untersuchten Fälle führten zu genau identischen Elektrophero-Chromatogrammen. Es ergeben sich keine Unterschiede in der Zusammensetzung der freien Liquoraminosäuren zwischen den verschiedenen in Tabelle 1 aufgeführten Fällen. Die betreffenden Säuren kommen sowohl beim Normalen wie bei den von uns untersuchten pathologischen Fällen vor. Ihr regelmäßiger Nachweis scheint nur von der Sorgfalt des methodischen Vorgehens abzuhängen.

Bei den ersten von uns untersuchten, hier nicht berücksichtigten Fällen konnten auch wir nur wenige Aminosäuren sicher identifizieren, etwa 8, später höchstens 10 oder 12. Mit fortschreitender Verbesserung der Methodik wurden dies aber immer mehr, besonders nach Einführung der sehr empfindlichen und differenzierte Farbnuancen liefernden Ninhydrinfärbung nach LEVY und CHUNG (40). Die Kombination von elektropherographischer und papierchromatographischer Trennung auf demselben Bogen ohne den Nachteil eines zwischengeschalteten Elutionsschrittes, wirkte sich günstig aus.

Die von uns im Liquor gefundenen Säuren sind ohne Zweifel die wichtigsten im Körper überhaupt nachgewiesenen Aminosäuren. Das freie Vorkommen aller anderen Aminosäuren in Körperflüssigkeiten ist bisher strittig. In keiner uns bekannten Arbeit wurde über die von uns nachgewiesenen Aminosäuren hinaus noch eine weitere im Liquor gefunden, mit Ausnahme von Citrullin, das BAUER u. BOESCHE (6) in einem einzigen Fall nachgewiesen haben. Jedoch versehen die Autoren diesen Nachweis selber mit einem Fragezeichen.

Zur Erklärung der Tatsache, daß manche Aminosäuren von verschiedenen Autoren nur in einigen Fällen gefunden wurden, mögen unsere eigenen Erfahrungen mit dem Nachweis von Phenylalanin, Methionin, Cystin und Prolin dienen. Während alle anderen Aminosäuren sicher oberhalb der Empfindlichkeitsgrenze unserer "Standardmethodik" lagen, trifft dies für die oben genannten nur mit Einschränkung zu. Prolin und Cystin konnten auf den zweidimensionalen Elektro-

phero-Chromatogrammen überhaupt nicht entdeckt werden, Methionin und vor allem Phenylalanin nur in etwa 50 % der Fälle. Trotzdem waren die vier Stoffe in allen Liquores regelmäßig vorhanden und konnten sicher nachgewiesen werden, wenn wir etwas mehr Liquor auftrugen und die eindimensionalen Chromatogramme oder Elektropherogramme mit Reagenzien behandelten, die mit diesen Stoffen charakteristische Farbreaktionen geben. Hätten wir uns auf die Ninhydrin-Färbung nach LEVY u. CHUNG, mit der diese Stoffe weniger gut darstellbar sind, beschränkt, hätten wir leicht zu dem irrtümlichen Schluß kommen können, diese Substanzen seien überhaupt nicht oder nicht in allen Fällen vorhanden. Ihre Konzentration liegt eben für unsere "Standardmethodik" in dem kritischen Bereich, in dem es oft von kleinen Zufälligkeiten abhängen kann, ob sie im Einzelfall als distinkter Farbfleck abgegrenzt oder übersehen werden.

Das Fehlen einer der sonst im Körper vorkommenden Aminosäuren im Liquor spricht unserer Ansicht nach eher für eine für diese Aminosäure ungenügend empfindliche Nachweismethode als für ein tatsächliches Nichtvorhandensein. Denn wir glauben, daß prinzipiell alle Aminosäuren, die im Blut oder überhaupt im Körper vorkommen, wenigstens in Spuren in den Liquor gelangen. Die freien Aminosäuren sind ja in erster Linie Bausteine von Eiweißkörpern. Da das Gehirn selbst die verschiedensten Eiweißkörper enthält - man denke nur an die Unzahl der verschiedenen Fermente und Wirkstoffe - zu deren Aufbau sicher alle, auch die selteneren Aminosäuren beitragen, werden diese sicher auch in die, die Gehirnzellen umspülende extracelluläre Flüssigkeit und damit in den Liquor gelangen. Die Frage ihres konstanten Nachweises ist dann nur eine Frage der Methodik. Diese Auffassung schließt die Tatsache, daß Liquor kein einfaches Ultrafiltrat des Blutserums ist, nicht aus. Im Gegenteil, er hat sehr wohl seine bestimmte vom Blutserum abweichende Zusammensetzung gerade im Bereich der freien Aminosäuren (RICHTER, DAWSON u. RESS /56/, SCHÖNENBERG /62/, BAUER u. BOESCHE /6/ u. a.). Aber diese Abweichungen beziehen sich in erster Linie auf das quantitative Verhältnis der einzelnen Aminosäuren untereinander und sind nach unserer Ansicht ein Ausdruck der vom Gesamtkörper abweichenden Stoffwechselleistung und Eiweißzusammensetzung der Gehirnzellen, die damit auch ein abweichendes Verhalten der Extracellulärflüssigkeit mit sich bringt. Der Vergleich der im Hirngewebe bzw. Hirnpreßsaft und der im Liquor selbst hauptsächlich vorkommenden freien Aminosäuren (ANSEL u. RICHTER /2/, DAWSON /15/, HARRIS /23/ u. a.), spricht jedenfalls sehr dafür.

Was hat nun die Erkenntnis vom konstanten Vorkommen sämtlicher Aminosäuren im Liquor für Folgerungen für die Versuche, die qualitative Bestimmung dieser Säuren für die Klinik nutzbar zu machen? Denn der Arzt und Kliniker

muß sich ja bei allen Untersuchungen im Laboratorium auch die Frage vorlegen, was nützen ihm seine Methoden oder Erkenntnisse am Krankenbett. Hier sind unsere Erwartungen nun ziemlich pessimistisch. Denn wenn man bei geeigneter Methodik ständig sämtliche Aminosäuren findet, und zwar auch beim Normalfall, sind von qualitativen Untersuchungen, d.h. von der bloßen Feststellung einer bestimmten Substanz, von vornherein keine wesentlichen Erkenntnisse, insbes. keine diagnostischen Hinweise zu erwarten. Wie in der Einleitung bereits ausgeführt, sind stichhaltige Beobachtungen, die ein für irgendeine Krankheit charakteristisches Aminosäurespektrum ergeben hätten, nicht erbracht worden. Derselben Ansicht sind auch LUDEWIG (42), RICHTER, DAWSON u. RESS (56), SCHÖNENBERG (62), WALKER, TELLES u. PASTORE (75) und BAUER u. BOESCHE (6). Es gibt aber einige Sonderfälle, auf die weiter unten eingegangen werden soll.

Wir haben quantitative Untersuchungen nicht erstrebt, da sie, wenn sie exakt sein sollen, einen zu großen methodischen Aufwand erfordert hätten. Der rein visuelle Vergleich der verschiedenen Elektrophero-Chromatogramme, bei denen ja immer dieselbe Ausgangsmenge verwandt wurde, ergab hinsichtlich Größe und Intensität der verschiedenen Flecke keine wesentlichen Unterschiede.

Die Frage, was von quantitativen Untersuchungen prinzipiell zu erwarten ist, soll nur kurz gestreift werden. BAUER u. BOESCHE (6) stellen die Angaben von WALKER, TELLES u. PASTORE (75), die für Glutamin 7, 2 mg% als Mittelwert angeben, denen von LOGOTHETIS (41) von 3, 0 mg% gegenüber und weisen unter Berücksichtigung der jeweils angegebenen Standardabweichung darauf hin, daß ein Glutamingehalt, der bei dem einen Autor als hochgradig vermehrt erscheint, bei dem anderen noch unter dem Mittelwert liegt. Solch ungeheure Schwankungsbreiten finden sich in der ganzen übrigen Literatur. Der Gehalt an Glutamin ist nun noch der höchste von allen Aminosäuren im Liquor. Bei den anderen Aminosäuren schwanken die Angaben noch mehr. Wenn dies sicher zum großen Teil durch die Verschiedenartigkeit der Methodik bedingt ist, und man daher zwei Ergebnisse, die von verschiedenen Autoren mit verschiedener Methodik gewonnen wurden, kaum vergleichen kann, so finden sich auch bei ein und demselben Autor von Fall zu Fall erhebliche Schwankungen. Ähnlich verhalten sich übrigens auch andere niedermolekulare Stoffe, wie z.B. die Zucker (JANIK /29/). Die Zusammensetzung des Liquors wird nicht wie die des Blutes durch zahlreiche Organe und Mechanismen konstant gehalten. Sie wechselt schon beträchtlich von den Hirnventrikeln über die Zisternen bis zum Spinalkanal (STEGER /67/, SCHMIDT u. MATHIAR /58/, SMITH, TAYLOR

u. HUNTER /65/, SCHÖNFELD u. LEIPOLD /63/, BOURDILLON, FISCHER-WILLIAMS, SMITH u. TAYLOR /9/).

Bei der Variabilität und großen Schwankungsbreite ist es schwer vorstellbar, daß Krankheiten, die aufs ganze gesehen doch nur einen kleinen Anteil sämtlicher Gehirnzellen befallen, wie beispielsweise die Systemerkrankungen - das gleiche gilt auch für kleinere Tumoren, überhaupt für alle irgendwie lokalisierten Prozesse - die Zusammensetzung des Liquors über die große physiologische Schwankungsbreite hinaus so weit verändern, daß sie faßbar werden. Dies gilt zumindest für so einfache und ubiquitäre Grundbausteine wie die Aminosäuren, die von allen Zellen, gesunden oder kranken, im Zellstoffwechsel benötigt oder freigesetzt werden. Von Stoffen, die normalerweise überhaupt nicht vorkommen, kann man sich das eher vorstellen. Bei den hochmolekularen und daher nicht diffusiblen Körpern wie den Eiweißen und den an Eiweiß gekoppelten Bestandteilen scheinen einmal viel konstantere quantitative Verhältnisse zu bestehen (MUMENTHALER u. MÄRKI /50/, BÜCHER, MATZELT u. PETTE /11/, DELANK /16/), zum anderen ist eine ganze Reihe pathologisch gebauter Eiweißkörper bekannt, die normalerweise nicht vorkommen. Die Analyse der Liquoreiweißkörper ist daher für die Klinik viel lohnender geworden (BAUER /5/, BÜCHER, MATZELT u. PETTE /11/, MÖSCHLIN /46/, SCHINKO u. TSCHABITSCHER /57/, STEGER /67/). Vielleicht ergibt auch die Bestimmung von Stoffen mit Wirkstoffcharakter, wie sie im Gehirn gewisse Amine darzustellen scheinen (VOGT /72/, PLETSCHER /53/, MONTAGU /47/, WEIL-MALHEBRE u. BONE /77/, MANGER u. Mitarb. /43/), für die klinische Diagnostik brauchbarere Gesichtspunkte. Denn es wäre denkbar, daß diese Amine, die normalerweise in Zellen gespeichert werden und frei nur in geringer Konzentration vorkommen, unter Umständen vermehrt freigesetzt werden. Für die Aminosäuren erwarten wir auch von quantitativen Bestimmungen recht wenig.

Eine Ausnahme machen nur einige wenige in der Einleitung bereits gestreifte Zustände mit excessiver Vermehrung einzelner oder aller Aminosäuren. Hierher gehören einmal gewisse seltene Stoffwechselstörungen wie die Phenylketonurie (JERVIS u. Mitarb. /30/, SCHÖNENBERG /62/), ferner Zustände wie Leberkoma und Urämie (WALSHE /76/, SCHÖNENBERG /62/ u. a.). Schließlich machen Erkrankungen, die mit erheblicher Veränderung der Blutliquorschranke bzw. Bluthirnschranke einhergehen, wie die Meningitiden (BOURDILLON u. Mitarb. /9/, VERRON u. VERRON /71/, FINK /20/) eine Ausnahme. Hierbei kann es nämlich zu weitgehender Angleichung der Liquoraminosäuren an diejenigen des Blutserums kommen (SCHÖNENBERG /62/ u. a.). Genauso verhält sich nach den Arbeiten von CRONE (14) auch die Harnsäure. Der klinische Wert dieser Feststellung, vor allem für die Diagnostik, ist jedoch gering. Bei den

zuerst genannten Erkrankungen handelt es sich nämlich um solche, bei denen auch die Blutaminosäuren stark erhöht sind. Der Liquor ist nur sekundär mitbetroffen. Die Erhöhung des Phenylalaninspiegels bei Phenylketonurie z.B. läßt sich im besser zugänglichen Blut leichter feststellen. Bei den zuletzt genannten Erkrankungen wird der Grad der Liquorveränderungen eben vom Grad der Schrankenstörung abhängen. Daher wird gerade bei den strittigen Fällen von umschriebenen oder zweifelhaften Meningitiden, die dann auch mit geringer Schrankenstörung einhergehen, die Bestimmung der Liquoraminosäuren im Stich lassen. Das sind aber die Fälle, bei denen man sich am dringlichsten eine Erweiterung der diagnostischen Möglichkeiten erhoffen würde.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wird eine Methode zum qualitativen Nachweis der Aminosäuren im Liquor cerebrospinalis beschrieben, die mit großer Exaktheit auch die nur in geringer Konzentration vorliegenden Aminosäuren zu erfassen gestattet.

2. Erstmalig werden im Liquor cerebrospinalis des Menschen regelmäßig 21 Aminosäuren, Taurin sowie drei unbekannte Substanzen, von denen zwei wahrscheinlich Amine sind, nachgewiesen. Dazu kommen in etwa der Hälfte der Fälle noch zwei weitere unbekannte Substanzen, wahrscheinlich niedere Peptide.

3. Diese Ergebnisse werden den bisher vorliegenden Mitteilungen der Literatur gegenübergestellt.

4. Die Bedeutung der Bestimmung der Liquoraminosäuren für die Klinik wird diskutiert. Als neues diagnostisches Verfahren der Klinik wird sie abgelehnt.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Acher, R., Fromageot, C. u. Jutisz, M.: Séparations chromatographiques d'acides aminés et de peptides. Biochim. biophys. Acta 5, 81 (1950).
2. Ansel, G.B. and Richter, D.: A Note of the Free Amino Acid Content of Rat Brain. Biochim. J. 57, 70 (1954).
3. Astrup, T., Stage, A. and Olsen, E.: A Desalting Apparatus for Amino Acids. Acta chem. scand. (Kopenh.). 5, 1343 (1951).
4. Barrollier, J., Heilmann, J. und Watzke, E.: Polychrome Sichtbarmachung von Aminosäuren auf Papierchromatogrammen und -elektropherogrammen. Hoppe-Seyler Z. physiol. Chem. 304, 24 (1956).
5. Bauer, H.: Pathochemische Probleme der multiplen Sklerose. Medizinische. 1019 (1956).
6. Bauer, H. und Boesche, P.: Die freien Aminosäuren des Liquors bei der multiplen Sklerose. Klin. Wschr. 35, 511 (1957).
7. Bode, F.: Eine Vereinfachung und Verbesserung der Methode zur quantitativen Bestimmung von Aminosäuren und Peptiden mittels des Ninhydrin-Kupferkomplexes. Biochem. Z. 326, 433 (1955).
8. Boulanger, P. und Biserte, G.: Chromatographie de partage des aminoacides libres du plasma sanguin. Bull. soc. chim. biol. 31, 696 (1949).
9. Bourdillon, R.B., Fischer-Wialliams, M., Smith, H.V. and Taylor, K.B.: The Entry of Radiosodium and of Bromide into Human Cerebrospinal Fluid. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr. 20, 79 (1957).
10. Brüggemann, J. nd Drepper, K.: Eine einfache Methode zur quantitativen Bestimmung von Aminosäuren auf Papierchromatogrammen. Naturwiss. 39, 301 (1952).
11. Bücher, Th., Matzelt, D. und Pette, D.: Papier-Elektrophorese von Liquor cerebrospinalis. Klin. Wschr. 30, 325 (1952).
12. Consden, R., Gordon, A.H. and Martin, A.J.: Qualitative Analysis of Proteins: A Partition Chromatographic Method Using Paper. Biol. J. 38, 225 (1944).
13. Consden, R., Gordon, A.H. and Martin, A.J.: The Identification of Lower Peptides in Complex Mixtures. Biochim. J. 41, 590 (1947).
14. Crone, Ch.: Uric Acid in the Cerebrospinal Fluid. Dan. Med. Bull. 4, 22 (1957).
15. Dawson, R.M.C.: Studies on the Glutamine and Glutamic Acid Content of the Rat Brain During Insulin Hypoglycaemia. Biochem. J. 47, 386 (1950).

16. Delank, H. W.: Der Liquor cerebrospinalis bei der sogenannten Hirnatrophien. Fortschr. Neurolog. Psychiatr. 25, 355 (1957).

17. Dent, C. E.: A Study of the Behavior of Some 60 Amino-Acids and Other Ninhydrin-Reacting Substances on Phenol - "Collidine" Filter Paper Chromatograms, with Notes as to the Occurence of Some of Them in Biological Fluids. Biochem. J. 43, 169 (1948).

18. Dose, K. und Caputo, A.: Die Anwendung der Hochspannungspherographie bei der quantitativen Totalanalyse von Proteinhydrolysaten. Biochem. Z. 328, 376 (1956).

19. Dose, K.: Die Anwendung der Hochspannungspherographie bei der quantitativen Totalanalyse von Proteinhydrolysaten. (2. Mitteilung). Biochem. Z. 329, 416 (1957).

20. Fink, W.: Über die Permeabilität der Blutliquorschranke und der Bluthirnschranke bei experimenteller Meningitis und bei Fieber. Zntrlbl. Allg. Pathol. Pathol. Anat. 96, 477 (1957).

21. Folin, O.: Blood Analysis. J. Biol. Chem. 51, 377 (1922).

22. Giri, K. V. and Nagabhushanam, A.: Sodium 1,2-naphtoquinone-4-sulfonate as a Reagent for Identification of Amino Acids and Peptides for the Quantitative Estimation of Proline and Hydroxyproline Seperated on Paper Chromatograms. Naturwiss. 39, 548 (1952).

23. Harris, M. M., Roth, R. T. and Harris, R. S.: Studies Regarding a Glutamine-like Substance in Blood and Spinal Fluid, Including a Method for Its Quantitative Determination. J. Clin. Ivest. 22, 569 (1943).

24. Heffe, W.: Persönliche Mitteilung.

25. Heilmann, J., Barrollier, J. und Watzke, E.: Beitrag zur Aminosäurebestimmung auf Papierchromatogrammen. Hoppe-Seyler Z. physiol. Chem. 309, 219 (1957).

26. Heilmeyer, L., Clotten, R., Sano, I., Sturm, A. jun. und Lipp, A.: Analyse des Reststickstoffes mit Hilfe des Hochspannungspherogramms. Klin. Wschr. 32, 831 (1954).

27. Heilmeyer, L., Clotten, R. und Lipp, A.: Analyse des Reststickstoffes mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese. Wien. Z. inn. Med. 38, 353 (1957).

28. Hoppe-Seyler / Thierfelder: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. 10. Aufl. Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg (1953) S. 321.

29. Janik, F.: Liquorzuckerbefunde bei Kaninchen. Klin. Wschr. 14, 1077 (1935).

30. Jervis, G.A., Block, R.J., Bolling, D. and Kanze, E.: Chemical and Methabolic Studies on Phenylalanine. J.Biol. Chem. 134, 105 (1940).

31. Kawerau, E. und Wieland, Th.: Conservation of Amino Acids Chromatograms. Nature (Lond.) 168, 77 (1951).

32. Kazmeier, F.: Vergleichende Untersuchungen über die Aminosäurenzusammensetzung des Serums- und Liquoreiweißes. Z.klin. Med. 151, 101 (1953).

33. Kemali, P. und Porcellati, G.: Chromatografia degli aminoacidi liberi nel liquor umano normali. Boll. Soc. ital. biol. sper. 28, 1275 (1952).

34. Kemali, P. und Porcellati, G.: Accorgimenti di tecnica per il dossagio quantitativo degli aminoacidi liberi nel liquido cefalorachidiano. Boll.Soc. ital. biol. sper. 28, 1277 (1952).

35. Kemali, P. und Porcellati, G.: Primi dosagi nel liquor degli aminoacidi liberi rivelati con la ripartizione chromatografica. Bull. Soc. ital. biol. sper. 28, 1280 (1952).

36. Kemali, P. und Porcellati, G.: Prezisazoni in tena di chromatografia degli aminoacidi liberi del liquido cefalorachidiano. Boll. Soc. ital. biol. sper. 29, 1182 (1953).

37. Kickhöfen, B. und Westphal, O.: Trennung der Aminosäuren- und Peptidgemische durch Hochspannungs-Papierionophorese. Z. Naturforsch. 7b, 655 (1953).

38. Kickhöfen, B. und Westphal, O.: Über eine einfache Kombination von Papierelektrophorese und Papierchromatographie. Z. Naturforsch. 7b, 659 (1953).

39. Kofrànyi, E.: Über qualitative Papierchromatographie von Aminosäuren in Proteinhydrolisaten. Hoppe-Seyler Z. physiol. Chem. 299, 129 (1955).

40. Levy, A.L. and Chung, D.: Two-Dimensional Chromatography of Amino Acids on Buffer Paper. Analyt. Chem. 25, 396 (1953).

41. Logothetis, J.: A Study of Free Amino Acids in the Human Cerebrospinal Fluid. Neurology (Minneapolis). 5, 767 (1955).

42. Ludewig, S.: Glutamine, Glutamic Acid and g-Aminobutyric Acid in Cerebrospinal Fluid. A.M.A. Arch. Neurolog. Psychiatr. 70, 262 (1953).

43. Manger, W.M., Schwarz, B.E., Bears, C.W., Wakim, K.G., Bollman, J.L., Petersen, M.C. and Berkson, J.: Epinephrine and Arterenol (Norepinephrine) in Mental Diseases. A. M.A. Arch. Neurolog. Psychiatr. 78, 396 (1957).

44. Michl, H.: Über Papierionophorese bei Spannungsgefällen von 50 Volt/cm. Mh. Chem. 82, 489 (1951).

45. Michl, H.: Über Papierionophorese bei Spannungsgefällen von 50 Volt/cm. (2. Mitteilung). Mh. Chem. 83, 737 (1952).

46. Moeschlin, S.: Veränderungen des Liquor cerebrospinalis beim plasmozytären Myelom. Schweiz. med. Wschr. 73, 1043 (1943).

47. Montagu, K.A.: Catechol Compaunds in Rat Tissues and in Brains of Different Animals. Nature 180, 244 (1957).

48. Moore, S. and Stein, W.H.: Chromatography of Amino Acids on Sulfonated Polysterine Resisn. J. Biol. Chem. 192, 663 (1951).

49. Moore, S. and Stein, W.H.: Procedures for the Chromatographic Determination of Amino Acids on Four per cent Crosslinked Sulfonated Polysterine Resisn. J. Biol. Chem. 211, 893 (1954).

50. Mumenthaler, M. und Märki, H.sen.,: Über die Methodik und die Bedeutung der Liquorelektrophorese. Helv. Med. Act. 23, 539 (1956).

51. Pasieka, A.E. and Morgan, J.F.: The Identification of Phenylalanine on Paper Chromatograms. Biochim. Biophys. Act. 19, 366 (1956).

52. Pasieka, A.E. and Morgan, J.F.: Quantitative Determination of Phenylalanine on Paper Chromatograms. Analyt. Chem. 28, 1964 (1956).

53. Pletscher, A.: Wirkung von Isopropyl-isonikotinsäurehydrazid auf den Stoffwechsel von Catecholaminen und 5-Hydroxytryptamin im Gehirn. Schweiz. Med. Wschr. 87, 1532 (1957).

54. Pond, M.H.: Some Studies of the Amino-Acids in Body Fluids in Patients with Various Forms of Mental Diseases by Paper Partition Chromatography. J. Ment. Sc. 96, 1048 (1950).

55. Reitman, F.: The Significance of Amino Acids in Neuropsychiatric Diseases. J. Ment. Sc. 100, 149 (1954).

56. Richter, D., Dawson, R.M.C. and Ress, L.: A Note of the Amonium and Glutamine Contant of the Cerebrospinal Fluid. J. Ment. Sc. 95, 148 (1949).

57. Schinko, H. und Tschabitscher, H.: Der g-Quotient als Ausdruck der Relation Liquor- zu Serum-g-Globulin. Wien. Klin. Wschr. 69, 705 (1957).

58. Schmidt, C. und Mathiar, H.: Das qualitative Verhältnis der Serum- und Liquorproteine. Dtsch. Z. Nervenheilk. 174, 443 (1956).

59. Schönenberg, H.: Papierchromatographische Liquoruntersuchungen. Die papierchromatographische Darstellung der Aminosäuren des normalen Liquor cerebrospinalis vor und nach Hydrolyse. Z. Kinderheilk. 73, 8 (1953).

60. Schönenberg, H.: Papierchromatographische Liquoruntersuchungen. Die Papierchromatographie der Aminosäuren des Liquors bei zentralnervösen entzündlichen Erkrankungen. Z. Kinderheilk. 75, 301 (1954).

61. Schönenberg, H.: Möglichkeiten und Grenzen der Liquoruntersuchungen bei der entzündlichen zentralnervösen Erkrankung im Kindesalter. Ärztl. Forsch. 9, 33 (1955).

62. Schönenberg, H.: Die Papierchromatographie des Liquor cerebrospinalis. Nervenarzt 27, 54 (1956).

63. Schönfeld, W. und Leipold, W.: Untersuchungen mit Farbstoffen an Syphylitikern und Nichtsyphylitikern und über die Wechselbeziehungen zwischen Blut und Hirnrückenmarkflüssigkeit. Z. Ges. Neurol. Psychiatr. 95, 473 (1925).

64. Solomon, J.D., Hier, S.W. and Bergeim, O.: Free Amino Acids in Cerebrospinal Fluid. J. Biol. Chem. 171, 695 (1947).

65. Smith, H.V., Taylor, L.M. and Hunter, G.: J. Nerolog. Neurosurg. Psychiatr. 18, 237 (1955). (Zit. nach 9).

66. Spengler, G.A. und Knedel, M.: Anwendung von Hochspannungselektrophorese und kombinierter Färbung zur qualitativen Identifizierung von Aminosäuren in Eiweißhydrolisaten. Klin. Wschr. 34, 389 (1956).

67. Steger, J.: Elektrophoretische Untersuchungen von eiweißarmen Körperflüssigkeiten (Liquor und Urin). Münch. Med. Wschr. 96, 747 (1954).

68. Stein, W.H. and Moore, S.: Elektrolytic Desalting of Amino acids: Conversion of Arginine to Ornithine. J. Biol. Chem. 190, 103 (1951).

69. Torre, M., Scarzella, T. und Zanalda, A.: Ricerta chromatografica con dati quantitativi degli aminoacidi liberi del liquor di soggeti normali. Boll. Soc. ital. biol. sper. 29, 196 (1953).

70. Turba, F.: Chromatographische Methoden in der Protein-Chemie. Springer-Verlag. Berlin-Göttingen-Heidelberg (1954). S. 89.

71. Verron, G. und Verron, I.: Die Blutliquorschranke für Depot-Penicillin im Kindesalter. Z. Kinderheilk. 76, 320 (1955).

72. Vogt, M.: Sympathomimetic Amines in the Central Nervous System. Brit. Med. Bull. 13, 166 (1957).

73. Waelsch, H.B.: Nitrogen Metabolism in the Brain. The Biology of Mental Health and Disease. Hoeber-Verlag (1952). New York S. 106.

74. Walker, B.S., Telles, N.C. and Pastore, E.J.: Paper Chromatography of the Amino Acids of Cerebrospinal Fluid. Ann. New York Acad. Sc. 58, 595 (1954).

75. Walker, B.S., Telles, N.C. and Pastore, E.J.: Amino Acids of the Cerebrospinal Fluid. A.M.A. Arch. Neurolog. Psychiatr. 73, 149 (1955).

76. Walshe, J.M.: Disturbances of Amino Acid Metabolism Following Liver Injury. Quart. J. Med. 22, 483 (1953).

77. Weil-Malherbe, H. and Bone, A.D.: Intracellular Distribution of Catecholamines in the Brain. Nature 180, 1050 (1957).

78. Werner, G.: Eine Apparatur zur Hochspannungs-Papierelektrophorese. Rec. Trav. chem. Pays-Bas. 74, 613 (1955).

79. Werner, G. und Westphal, O.: Stofftrennungen durch Hochspannungs-Papierelektrophorese. Angew. Chem. 67, 251 (1955).

80. Wieland, Th. und Pfleiderer, G.: Analytische und Mikropräparative Träger-elektrophorese mit höheren Spannungen. Angew. Chem. 67, 257 (1955).

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. H. Zickgraf für die freundliche Überlassung eines Arbeitsplatzes in seinem Labor und die Bereitstellung der für diese Arbeit erforderlichen Mittel danken.

Besonders darf ich Herrn Dr. H.G. Knauff herzlich für die Problemstellung, sachlichen Anregungen und für die freundliche Hilfe beim Zusammenfassen der Arbeit danken.

L E B E N S L A U F

Am 9.5.1928 wurde ich, Wolodymyr G. Mialkowsky, als Sohn des Arztes Georg G. Mialkowsky und seiner Frau Anna Mialkowsky, geb. Klymiuk, in Luck / West Ukraine (damals Polen) geboren.

Von 1934 bis 1938 besuchte ich die Volksschule in Luck und anschließend von 1938 bis 1941 das Gymnasium in Luck und Przemysl. Von 1945 bis 1948 besuchte ich das Ukrainische Gymnasium in Regensburg und legte am 11.6.1948 die Reifeprüfung vor der Prüfungskommission des Bayerischen Kultusministeriums ab.

Bis 1950 besuchte ich das Sprachen Institut (Language Institute) der CWS in Ulm und arbeitete anschließend bei der Flüchtlingsorganisation der UNO als Resettlement Officer und Dolmetscher für deutsche, russische, englische, polnische, tschechische und ukrainische Sprache. Während dieser Zeit erlernte ich zusätzlich in Abendkursen das technische Zeichnen und das Arbeiten in photographischen Laboratorium.

1953 immatrikulierte ich mich als Student der Medizin an der Universität München, wo ich auch am 3.3.1956 die ärztliche Vorprüfung mit der Note II = gut bestanden habe und am 10.6.1959 vor dem Ausschuß für die ärztliche Prüfung das medizinische Staatsexamen mit der Note II ablegte.